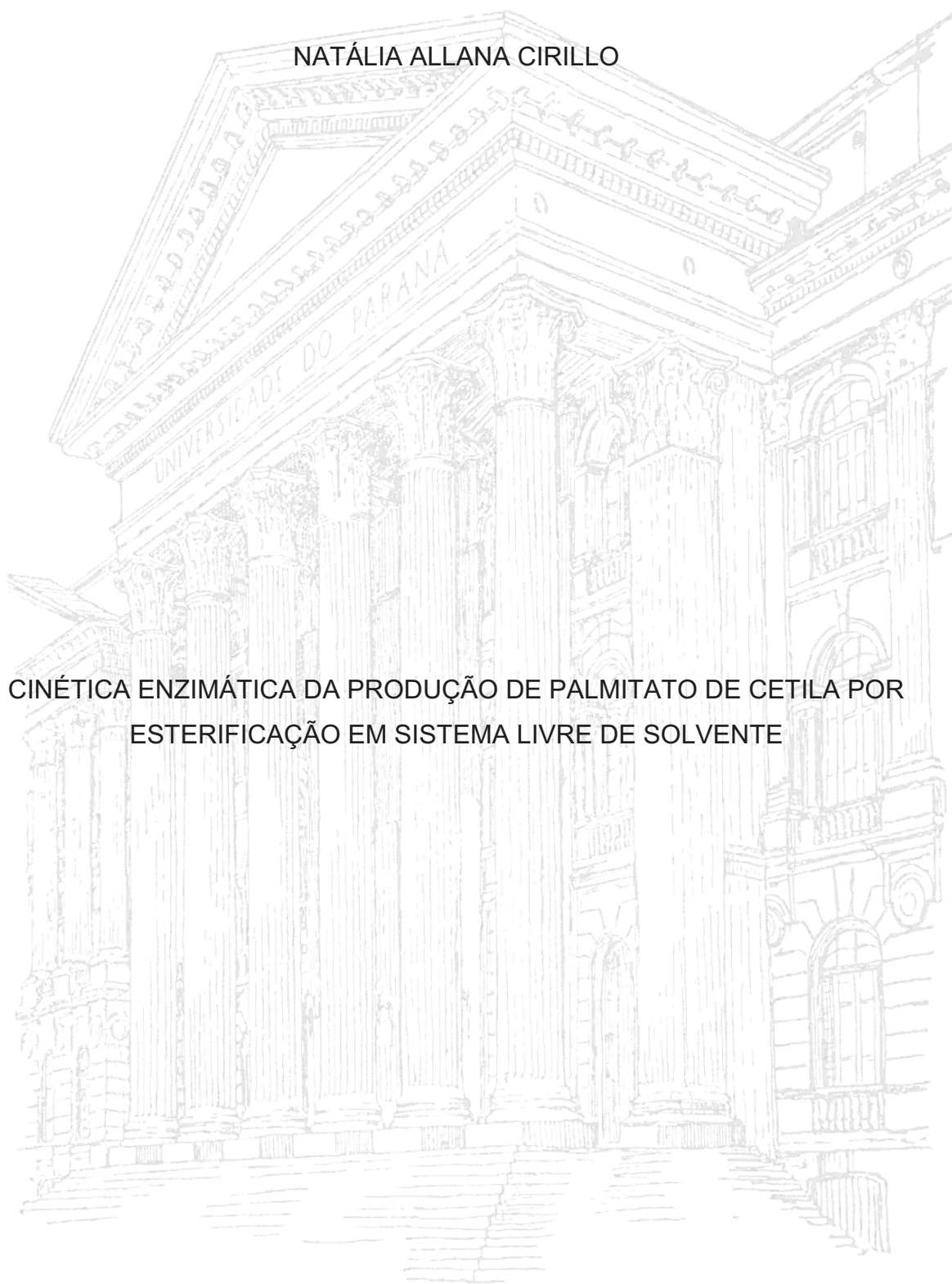


UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

NATÁLIA ALLANA CIRILLO

CINÉTICA ENZIMÁTICA DA PRODUÇÃO DE PALMITATO DE CETILA POR
ESTERIFICAÇÃO EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE



CURITIBA

2018

NATÁLIA ALLANA CIRILLO

CINÉTICA ENZIMÁTICA DA PRODUÇÃO DE PALMITATO DE CETILA POR
ESTERIFICAÇÃO EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE

Dissertação apresentada como requisito à obtenção do grau de Mestre em Engenharia Química, no Curso de Pós-Graduação em Engenharia Química, Setor de Tecnologia, da Universidade Federal do Paraná.

Orientador: Prof. Dr. Fernando Augusto Pedersen Voll
Coorientador: Prof. Dr. Marcos Lúcio Corazza

CURITIBA

2018

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELO SISTEMA DE BIBLIOTECAS/UFPR
BIBLIOTECA DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA

C578c

Cirillo, Natália Allana

Cinética enzimática da produção de palmitato de cetila por esterificação em sistema livre de solvente / Natália Allana Cirillo. – Curitiba, 2018.

85 p. : il. color. ; 30 cm.

Dissertação - Universidade Federal do Paraná, Setor de Tecnologia, Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, 2018.

Orientador: Fernando Augusto Pedersen Voll.

Coorientador: Marcos Lúcio Corazza.

1. Esterificação. 2. Ésteres de cera. 3. Lipase imobilizada. 4. Sistemas livres de solvente.
5. Modelagem cinética. I. Universidade Federal do Paraná. II. Voll, Fernando Augusto Pedersen.
III. Corazza, Marcos Lúcio. IV. Título.

CDD: 543



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
SETOR SETOR DE TECNOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO ENGENHARIA QUÍMICA

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ENGENHARIA QUÍMICA da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da dissertação de Mestrado de **NATÁLIA ALLANA CIRILLO** intitulada: **CINÉTICA ENZIMÁTICA DA PRODUÇÃO DE PALMITATO DE CETILA POR ESTERIFICAÇÃO EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE**, após terem inquirido a aluna e realizado a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 02 de Março de 2018.

FERNANDO AUGUSTO PEDERSEN VOLL

Presidente da Banca Examinadora (UFPR)

MARCELO KAMINSKI LENZI

Avaliador Interno (UFPR)

DEBORA DE OLIVEIRA

Avaliador Externo (UFSC)

AGRADECIMENTOS

Aos meus familiares, meus pais e meus irmãos, que de alguma forma me ajudaram na conclusão deste trabalho, sempre apoiando minhas decisões e me dando suporte para pudesse seguir com meus objetivos.

Ao meu orientador Professor Doutor Fernando Augusto Pedersen Voll e coorientador Professor Doutor Marcos Lúcio Corazza por todo ensinamento e orientação durante o mestrado, pelo auxílio e paciência nos momentos de dificuldade e pela contribuição científica que foi fundamental para desenvolvimento deste trabalho.

Ao Professor Doutor Marcelo Kaminski Lenzi pelo convite feito e pelo incentivo para ingressar no programa mestrado, e por estar sempre disponível para ajudar.

A todos meus amigos, pela amizade e companheirismo, tanto nos momentos de trabalho árduo, quanto nos momentos de descontração. Agradecimento especial aos amigos do Laboratório de Cinética e Termodinâmica Aplicada – Lacta da UFPR por estarem sempre dispostos a ajudar com a operação dos equipamentos, com as análises cromatográficas, por estarem sempre abertos às dúvidas que surgiram durante as pesquisas e por serem ótimas companhias durante os longos experimentos e no sagrado horário do café.

Aos demais professores do programa de Pós Graduação em Engenharia Química – PPGEQ da Universidade Federal do Paraná.

Ao CNPq e ao Capes pelas bolsas de mestrado e pelo auxílio financeiro.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para este trabalho.

*“O cientista não é o homem que
fornece as verdadeiras respostas; é quem
faz as verdadeiras perguntas”.
(Claude Lévi-Strauss)*

RESUMO

O palmitato de cetila é o componente principal de algumas ceras naturais, como das provenientes do crânio de cachalotes, superfícies de plantas, colmeias e folhas de carnaúba. É industrialmente utilizado em diversos setores, como para a produção de embalagens alimentícias, giz de cera, tintas para impressora, biolubrificantes, revestimento para madeira, agente antiespumante, vernizes, adesivos e principalmente na indústria de cosméticos. Como a exploração a partir de fontes naturais não é vantajosa nos aspectos técnicos e econômicos, para atender o mercado industrial, a produção sintética de cera tornou-se necessária. O objetivo deste trabalho consiste na síntese de palmitato de cetila por reação em batelada através da esterificação entre álcool cetílico e ácido palmítico em um sistema livre de solventes usando lipase comercial imobilizada *Lipozyme RM IM* como catalisador. Utilizou-se um reator de vidro encamisado para conduzir a reação e parâmetros como velocidade de agitação (180, 480 e 720 rpm), temperatura (60 °C, 70 °C, 80 °C e 87 °C), quantidade de catalisador (0,5%, 1,0% e 1,5% m/m de substratos) e razão molar (0,5:1, 1:1 e 2:1 álcool:ácido) foram variados. As condições ótimas obtidas foram 480 rpm, 70 °C, 1,0% de enzima e razão molar 1:1 em 3 horas. Um modelo cinético foi proposto baseado no mecanismo bi bi randômico sequencial. Seis parâmetros foram suficientes para ajuste satisfatório do modelo aos dados experimentais, com $RMSD_r$ de 1,867% e desvio padrão estimado de 2,003%. Uma equação para cálculo da velocidade de reação em função da temperatura foi proposta para descrever o comportamento de reações enzimáticas até a temperatura máxima de operação, onde há estabilização da velocidade devido à desativação térmica enzimática. O modelo indicou inibição competitiva de segunda ordem pelos reagentes e não indicou reação inversa significativa de hidrólise. O catalisador foi reutilizado após filtração com *n*-hexano e mostrou boa estabilidade, com a conversão da reação diminuindo apenas 6,8% após 15 ciclos.

Palavras-chave: esterificação; ésteres de cera, lipase imobilizada; sistemas livres de solvente; modelagem cinética.

ABSTRACT

Cetyl palmitate is the major component of some natural waxes, such as one originating from the skull of sperm whales, plant surfaces, hives and carnauba leaves. It is industrially applied in several sectors, such as for the production of food packaging, crayons, printer inks, biolubricants, wood coating, antifoaming agent, varnishes, adhesives, and mainly in the cosmetics industry. As its exploitation from natural sources is not advantageous in technical and economic aspects, the synthetic production of wax has proved to be a necessity. The objective of this work is the synthesis of cetyl palmitate by batch esterification reaction of the cetyl alcohol with palmitic acid in a solvent-free system using commercial lipase *Lipozyme RM IM* as catalyst. A glass jacket vessel was used to conduct the reaction and parameters like speed agitation (180, 480 and 720 rpm), temperature (60 °C, 70 °C, 80 °C and 87 °C), amount of catalyst (0.5, 1.0 and 1.5% w/w of substrates) and molar ratio (0.5:1, 1:1 and 2:1 alcohol:acid) were vary. The optimum conditions obtained were 480 rpm, 70 °C, 1.0% of enzyme and 1:1 molar ratio in 3 hours of reaction. A novel kinetic model was proposed based on random-sequential bi-bi mechanism. Six parameters were sufficient to fit the model to the experimental data, with RMSD_r of 1.867% and estimated standard deviation of 2.003%. An equation for the reaction rate as a function of temperature was proposed to describe the behavior of enzymatic reactions up to the maximum operating temperature, where there is stabilization of speed due to the enzymatic thermal deactivation. The model indicated competitive second order inhibition by reagents and did not indicate a significant reverse hydrolysis reaction. The catalyst was reused after filtration with n-hexane and showed good stability, with reaction conversion decreasing only 6.8% after 15 cycles.

Key-words: esterification; wax ester; cetyl palmitate; immobilized lipase; solvent free synthesis; kinetic modeling.

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 4.1 - ESQUEMA DO EQUIPAMENTO PARA REAÇÃO EM BATELADA COM AGITAÇÃO MAGNÉTICA.	37
FIGURA 4.2 - DETALHES DO REATOR DE VIDRO ENCAMISADO E BARRA MAGNÉTICA.	37
FIGURA 4.3 - ESQUEMA REACIONAL COM AGITAÇÃO MECÂNICA PARA ESTUDO DE REUSO DA ENZIMA.	43
FIGURA 4.4 - DETALHAMENTO DO IMPELIDOR USADO NA AGITAÇÃO MECÂNICA.	44
FIGURA 4.5 - ESQUEMA PARA MECANISMO BI BI RANDÔMICO SEQUENCIAL PARA SÍNTESE DO PALMITATO DE CETILA.	48
FIGURA 4.6 - COMPORTAMENTO DA VELOCIDADE DE REAÇÕES ENZIMÁTICAS.	54
FIGURA 5.1 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO CATALISADOR ÁCIDO SULFÚRICO.	58
FIGURA 5.2 - INFLUÊNCIA DA VELOCIDADE DE ROTAÇÃO.	62
FIGURA 5.3 - DESVIO PADRÃO EXPERIMENTAL DA ANÁLISE CL5.	64
FIGURA 5.4 - GRÁFICO DE PARIDADE ENTRE CONVERSÃO EXPERIMENTAL E PREDITA.	65
FIGURA 5.5 - DIAGRAMA DE FASE SÓLIDO-LÍQUIDO PARA MISTURA BINÁRIA DE ÁLCOOL CETÍLICO E ÁCIDO PALMÍTICO.	66
FIGURA 5.6 - INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA.	67
FIGURA 5.7 - COMPARAÇÃO DA TAXA DE REAÇÃO DESCRITA PELA EQUAÇÃO DE ARRHENIUS E PELA EQUAÇÃO 4.54.	68
FIGURA 5.8 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE <i>LIPOZYME RM IM</i>	70
FIGURA 5.9 - INFLUÊNCIA DA RAZÃO MOLAR ÁLCOOL:ÁCIDO.	72
FIGURA 5.10 - VALIDAÇÃO PARA CONDIÇÕES DENTRO DA FAIXA DE CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E REGIÃO DE INCERTEZA DE PREDIÇÃO DO MODELO A 95% DE CONFIANÇA.	74
FIGURA 5.11 - VALIDAÇÃO PARA CONDIÇÕES DENTRO DA FAIXA DE CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E REGIÃO DE INCERTEZA DE PREDIÇÃO DO MODELO A 95% DE CONFIANÇA.	75
FIGURA 5.12 - ESTUDO DO REUSO DA ENZIMA COMERCIAL <i>LIPOZYME RM IM</i>	76

LISTA DE TABELAS

TABELA 3.1 - ARTIGOS REFERENTES A ESTERIFICAÇÃO EM BATELADA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE.....	30
TABELA 4.1 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA REAÇÕES COM CATÁLISE ÁCIDA.....	38
TABELA 4.2 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA TESTE DE ATIVIDADE CATALÍTICA DE SEMENTES OLEAGINOSAS NA SÍNTESE DE LAURATO DE PROPILA.....	39
TABELA 4.3 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA TESTE DE ATIVIDADE CATALÍTICA DA MAMONA.....	40
TABELA 4.4 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA REAÇÕES NA AUSÊNCIA DE CATALISADOR.....	40
TABELA 4.5 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA REAÇÕES CATALISADAS PELA <i>LIPOZYME RM IM</i> [®]	41
TABELA 5.1 - RESULTADOS DA SÍNTESE DE LAURATO DE <i>N</i> -PROPILA CATALISADA POR SEMENTES OLEAGINOSAS.....	59
TABELA 5.2 - RESULTADO DA SÍNTESE PALMITATO DE CETILA CATALISADA POR SEMENTE DE MAMONA.....	60
TABELA 5.3 - RESULTADOS PARA REAÇÕES NA AUSÊNCIA DE CATALISADOR.....	61
TABELA 5.4 - RESULTADOS DOS PARÂMETROS ESTIMADOS PARA O MODELO CINÉTICO PROPOSTO.....	64

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

α	-	Coeficiente angular da reta obtida da linearização da eq. de Arrhenius
β	-	Coeficiente linear da reta obtida da linearização da eq. de Arrhenius
σ	-	Desvio padrão médio
A	-	Fator de frequência
Ac	-	Álcool cetílico
Ap	-	Acido palmítico
AGL	-	Porcentagem mássica de ácido graxo na amostra (%)
AGL_t	-	Porcentagem mássica de acido no tempo t de reação (%)
$AGL_{t=0}$	-	Porcentagem mássica de acido no início da reação (%)
$Conversão_i^{calc}$	-	Conversão da reação calculada pelo modelo cinético (%)
$Conversão_i^{exp}$	-	Conversão experimental do ponto i da reação (%)
$Conversão_i^{exp,validação}$	-	Conversão experimental do ponto i da validação (%)
E	-	Enzima imobilizada <i>Lipozyme RM IM</i>
E_a	-	Energia de ativação
fc	-	Função genérica
fob	-	Função objetivo
k_c	-	Constante de limitação de transferência de massa ($g_{substrato}/mg_{enzima}$)
K_i (i= 1,..., 6)	-	Constantes do modelo ($g_{substrato}^2/mmole_{enzima}mmole_{substrato}$)
k_i (i= 1, 6, 7, 9, 11, 13)	-	Constantes da taxa ($g_{substrato}^2/(mmole_{enzima}mmole_{substrato}h)$)
k_i (i= 2, 3, 4, 5, 8, 10, 12, 14)	-	Constantes da taxa (h^{-1})
M_1	-	Constante da taxa aparente de esterificação ($g_{substrato}^2/((mmole_{enzima}mmole_{substrato}h))$)
M_2	-	Constante da taxa aparente de hidrólise ($g_{substrato}^2/((mmole_{enzima}mmole_{substrato}h))$)
$m_{amostra}$	-	Massa da amostra utilizada na titulação (g)
$MM_{H_2SO_4}$	-	Massa molar do ácido sulfúrico (g/mol)
MM_{enzima}	-	Massa molar teórica da enzima ($mg_{enzima}/mmole_{enzima}$)

M	-	Molaridade corrigida da solução de NaOH (mol/l)
$m_{t=0}^{Ap}$	-	Massa de ácido palmítico no início da reação (g)
m_{cat}	-	Massa de catalisador (g)
MM_{Ap}	-	Massa molar do ácido palmítico (g/mol)
m_{total}	-	Massa total do sistema reacional (g)
n	-	Número de pontos experimentais
$n_{t=0}^{Ap}$	-	Número de mols de ácido palmítico no início da reação (mols)
n_t^{Ap}	-	Número de mols de ácido palmítico no tempo t de reação (mols)
$n_{H_2SO_4}^{NaOH}$	-	Nº de mols de NaOH utilizados para neutralizar ácido sulfúrico (mols)
n_{total}^{NaOH}	-	Nº total de mols de NaOH utilizado para neutralização (mols)
N	-	Número de dados experimentais de validação
NE	-	Número total de dados experimentais
Pc	-	Palmitato de cetila
P_i (i=1, 2)	-	Constante da equação da taxa em função da temperatura ($g_{substrato}^2/(mg_{enzima}mmol_{substrato}h)$)
Pureza _{H₂SO₄}	-	Concentração de ácido sulfúrico (% mássica)
Q_i (i=1, 2)	-	Constante da equação de taxa em função da temperatura (K ⁻¹)
R	-	Constante universal dos gases
RM	-	Razão molar álcool:ácido
RMSD _p	-	Desvio médio quadrático de predição
RMSD _r	-	Desvio médio quadrático residual
T	-	Temperatura
t	-	Tempo
T _{ref}	-	Temperatura de referência (K)
V	-	Velocidade de reação
V ₁	-	Constante da taxa aparente de esterificação ($g_{substrato}^2/(mg_{enzima}mmol_{substrato}h)$)
V ₂	-	Constante da taxa aparente de hidrólise ($g_{substrato}^2/(mg_{enzima}mmol_{substrato}h)$)

V_{NaOH}	-	Volume de NaOH utilizado para neutralização da amostra (ml)
\bar{x}	-	Média das n conversões experimentais
x	-	Conversão experimental
$[\text{Ac}]$	-	Concentração de álcool cetílico ($\text{mmol}_{\text{substrato}}/\text{g}_{\text{substrato}}$)
$[\text{Ac}^*\text{E}^*\text{Ac}]$	-	Concentração do complexo álcool cetílico x enzima x ácido cetílico ($\text{mmol}_{\text{substrato}}/\text{g}_{\text{substrato}}$)
$[\text{Ac}^*\text{E}^*\text{Ap}]$	-	Concentração do complexo álcool cetílico x enzima x ácido palmítico ($\text{mmol}_{\text{substrato}}/\text{g}_{\text{substrato}}$)
$[\text{Ap}]$	-	Concentração de ácido palmítico ($\text{mmol}_{\text{substrato}}/\text{g}_{\text{substrato}}$)
$[\text{Ap}^*\text{E}^*\text{Ap}]$	-	Concentração do complexo ácido palmítico x enzima x ácido palmítico ($\text{mmol}_{\text{substrato}}/\text{g}_{\text{substrato}}$)
$[\text{E}]$	-	Concentração molar de enzima livre ($\text{mmol}_{\text{enzima}}/\text{g}_{\text{substrato}}$)
$[\text{E}_t]$	-	Concentração molar de enzima total ($\text{mmol}_{\text{enzima}}/\text{g}_{\text{substrato}}$)
$[\text{Etd}]$	-	Concentração mássica de enzima efetivamente disponível para reagir ($\text{mg}_{\text{enzima}}/\text{g}_{\text{substrato}}$)
$[\text{E}_t^m]$	-	Concentração mássica de enzima total ($\text{mg}_{\text{enzima}}/\text{g}_{\text{substrato}}$)
$[\text{H}_2\text{O}]$	-	Concentração de água ($\text{mmol}_{\text{substrato}}/\text{g}_{\text{substrato}}$)
$[\text{H}_2\text{O}^*\text{E}^*\text{H}_2\text{O}]$	-	Concentração do complexo água x enzima x água ($\text{mmol}_{\text{substrato}}/\text{g}_{\text{substrato}}$)
$[\text{H}_2\text{O}^*\text{E}^*\text{Pc}]$	-	Concentração do complexo água x enzima x palmitato de cetila ($\text{mmol}_{\text{substrato}}/\text{g}_{\text{substrato}}$)
$[\text{Pc}]$	-	Concentração de palmitato de cetila ($\text{mmol}_{\text{substrato}}/\text{g}_{\text{substrato}}$)
$[\text{Pc}^*\text{E}^*\text{Pc}]$	-	Concentração do complexo palmitato de cetila x enzima x palmitato de cetila ($\text{mmol}_{\text{substrato}}/\text{g}_{\text{substrato}}$)

SUMÁRIO

1	DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO	15
2	INTRODUÇÃO	16
2.1	OBJETIVOS	17
2.1.1	Objetivo geral	17
2.1.2	Objetivos específicos	17
3	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
3.1	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	18
3.1.1	Mercado de cosméticos	18
3.1.2	Ceras e suas aplicações	20
3.1.2.1	Palmitato de Cetila	21
3.1.3	Reações de esterificação	21
3.1.4	Tipos de catálise	22
3.1.4.1	Lipases	23
3.1.5	Solventes	25
3.2	ESTADO DA ARTE	26
3.2.1	Catálise não enzimática	26
3.2.2	Catálise enzimática	27
3.2.2.1	Lipases de sementes	27
3.2.2.2	Lipases de microrganismos.....	28
3.2.3	Modelagem cinética	31
3.3	CONSIDERAÇÕES FINAIS	33
4	MATERIAIS E MÉTODOS	35
4.1	MATERIAIS.....	35
4.2	EQUIPAMENTOS	36
4.3	METODOLOGIA EXPERIMENTAL	36
4.3.1	Estudo de tipos de catalisadores.....	36
4.3.1.1	Catálise Ácida	38
4.3.1.2	Catálise por Sementes	38
4.3.1.3	Ausência de Catalisador – Branco de Reação	40
4.3.1.4	Catálise por Enzima Comercial Imobilizada	40
4.3.2	Estudo de reuso da enzima comercial imobilizada	43

4.4	ACOMPANHAMENTO DAS REAÇÕES E ANÁLISES QUÍMICAS.....	45
4.4.1	Cálculo da conversão para catálise ácida homogênea.....	45
4.4.2	Cálculo da conversão para catálise heterogênea.....	46
4.4.3	Cromatografia em fase gás.....	47
4.5	MODELAGEM CINÉTICA	47
4.5.1	Influência da temperatura.....	53
4.5.2	Métodos numéricos.....	56
5	APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS	58
5.1	CATÁLISE ÁCIDA.....	58
5.2	CATÁLISE POR SEMENTES OLEAGINOSAS.....	59
5.3	AUSÊNCIA DE CATALISADOR – BRANCO DE REAÇÃO	61
5.4	CATÁLISE POR ENZIMA COMERCIAL IMOBILIZADA	62
5.4.1	Análises da modelagem cinética	64
5.4.2	Influência da temperatura.....	66
5.4.3	Influência da concentração de catalisador.....	69
5.4.4	Influência da razão molar	71
5.4.5	Validação do modelo cinético.....	73
5.5	REUSO DA ENZIMA COMERCIAL IMOBILIZADA	75
5.6	CROMATOGRAFIA EM FASE GÁS	77
6	CONCLUSÕES	78
6.1	RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	79
	REFERÊNCIAS.....	80
	APÊNDICE I – CROMATOGRAMA REAGENTES.....	84
	APÊNDICE II – CROMATOGRAMA PRODUTOS.....	85

1 DIAGRAMA CONCEITUAL DO TRABALHO

PRODUÇÃO DO ÉSTER DE PALMITATO DE CETILA A PARTIR DE REAÇÃO DE ESTERIFICAÇÃO EM BATELADA E EM SISTEMAS LIVRE DE SOLVENTE.

POR QUÊ?

- Palmitato de cetila é um éster utilizado industrialmente na **produção de cosméticos** de produtos de higiene pessoal;
- Atua como emolientes e como regulador de viscosidade;
- É encontrado em poucas quantidades na natureza e em fontes de difícil acesso, portanto a obtenção a partir de fontes naturais é limitada e de alto custo.

QUEM JÁ FEZ?

- A síntese de ésteres de cadeia longa é um assunto recorrente na literatura, porém nenhum trabalho foi encontrado referente à síntese de palmitato de cetila catalisada por ácido sulfúrico, por sementes oleaginosas e pela enzima comercial *Lipozyme RM IM*;
- Os **modelos cinéticos** encontrados na literatura não descrevem com clareza o comportamento de reações enzimáticas próximos da temperatura máxima de operação, onde há início da desativação térmica enzimática.

HIPÓTESES

- A catálise ácida é eficiente para a produção de ésteres de cadeia longa?
- É possível utilizar sementes oleaginosas como fonte de lipase para catalisar reações de esterificação?
- É possível obter altas conversões utilizando enzimas comerciais imobilizadas?

COMO FAZER

- Reações em batelada livre de solvente;
- Utilização de diferentes tipos de catalisadores;
- Acompanhamento da reação por titulação com NaOH 0,1 M;
- Validação da titulação por cromatografia em fase gás;
- Estudo da reutilização da enzima comercial imobilizada.

RESPOSTAS

- Qual catalisador é mais eficiente e mais indicado pra produção de ceras;
- Como as condições de operação afetam a cinética enzimática;
- Condição ótima de operação para catálise por enzima *Lipozyme RM IM*;
- Capacidade do modelo cinético baseado em mecanismo bi bi sequencial aleatório de representar o sistema;
- Capacidade de reuso da enzima comercial *Lipozyme RM IM*;

2 INTRODUÇÃO

Ceras são ésteres de cadeia longa (12 carbonos ou mais), com alto valor agregado e alto grau de biodegradabilidade. Dentre as aplicações industriais das ceras, destacam-se a produção de lubrificantes, cosméticos, produtos de higiene pessoal, fármacos, revestimentos para madeira, agentes antiespumantes, tintas para impressão e vernizes. São encontradas na natureza na superfície de frutas, no crânio de baleias cachalote (*Physeter macrocephalus*), nas folhas de carnaúba (*Copernicia cerifera*) e em colmeias. Apesar de sua alta disponibilidade, sua obtenção a partir de fontes naturais é complicada, de acesso limitado, e geralmente de custo elevado, o que motiva a produção sintética das ceras.

O éster palmitato de cetila é o componente primário da cera encontrada na cavidade cranial das baleias cachalote e em corais, onde atua como antiaderente. Industrialmente, é utilizado na produção de cosméticos, pois tem característica emoliente que lubrifica e condiciona a pele. É utilizado como surfactante em xampus, como agente emulsionante e espessante em cremes e adiciona textura a vários produtos de maquiagem, geralmente nos que são em formato de bastão.

O método mais comum para a síntese de palmitato de cetila é a catálise enzimática. Muitas enzimas apresentam boa atividade catalítica em solvente orgânico. Contudo, há crescente preocupação com que os processos químicos sejam não só eficientes, mas também sejam amigáveis ao meio ambiente, econômicos e que o produto seja livre de contaminação. Por esse motivo, quando há miscibilidade entre os reagentes para promover o contato suficiente entre as moléculas e quando a enzima se mostra ativa nessa condição, o uso de sistemas livres de solvente é preferível.

Pesquisas científicas mostraram que as enzimas comerciais imobilizadas costumam fornecer bons rendimentos para a produção de diversos tipos de ésteres, mesmo em sistemas livres de solvente. As enzimas mais amplamente utilizadas na catálise enzimática de éster são as enzimas comerciais, como a *Lipozyme RM IM*[®] (lipase imobilizada 1,3 específica de *Rhizomucor miehei*), *Novozym 435*[®] (lipase imobilizada de *Candida antarctica B*), *Lipozyme TL IM*[®] (lipase imobilizada de *Thermomyces lanuginosus*).

Como as enzimas comerciais geralmente possuem custo elevado, é necessário encontrar condições de operação que favoreçam ao máximo o processo,

operando em temperaturas e quantidades de catalisador adequadas e redução da resistência à transferência de massa do meio. É importante também analisar a viabilidade de recuperação das enzimas do meio reacional e sua reutilização. Esses fatores contribuem para um processo sem custos excessivos e com produto de maior qualidade, mais viável e atrativo industrialmente.

2.1 OBJETIVOS

2.1.1 Objetivo geral

O objetivo desse projeto é o estudo da produção de ésteres de cadeia longa. O produto escolhido para o estudo é o palmitato de cetila, e três tipos de catalisadores distintos serão utilizados em reator batelada, sem adição de solventes.

2.1.2 Objetivos específicos

Os objetivos específicos do trabalho são:

- A) Identificação e seleção de catalisadores eficientes para a produção de palmitato de cetila;
- B) Levantamento cinético de dados experimentais da produção de palmitato de cetila utilizando enzima comercial imobilizada;
- C) A partir dos dados cinéticos obtidos, estudo da influência dos parâmetros operacionais (velocidade de agitação, temperatura, razão molar e concentração de catalisador) da síntese de palmitato de cetila;
- D) Modelagem da cinética enzimática e ajuste dos parâmetros baseado nos dados experimentais da catálise promovida por enzima comercial imobilizada;
- E) Estudo da reutilização da enzima comercial imobilizada em repetidos ciclos de reação.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1.1 Mercado de cosméticos

A cosmetologia é uma combinação de diversas ciências, dentre elas podem-se destacar química, física, biologia, dermatologia, microbiologia e toxicologia. Por ser uma área tão ampla, costuma ser dividida em cinco grandes áreas: produtos para a pele, cabelos, maquiagens, perfumes e produtos de higiene pessoal.

Segundo (PAYE *et al.*, 2009), embora se encontrem relatos de que os cosméticos, produtos de beleza e perfumes existam desde a origem da civilização, apenas a partir do século XX houve progresso na diversificação de produtos e melhorias referentes à segurança do consumidor final. Com o avanço da industrialização, diversos ingredientes provenientes de diferentes indústrias, como petroquímicas e alimentícias, por exemplo, começaram a ser utilizados na preparação de cosméticos, oferecendo maior diversidade de funções e novas características aos produtos. (PAYE *et al.*, 2009) Dessa forma, surgiu necessidade de regulamentação dos processos de produção e dos ingredientes utilizados por conta dos órgãos competentes.

O mercado de cosméticos pode ser dividido em duas grandes classes. A primeira refere-se aos cosméticos de luxo, ou seja, de custo mais elevado e com maior tecnologia empregada. A segunda classe refere-se aos produtos de massa, com menor custo e menor prestígio. Segundo Łopaciuk e Łoboda (2013), a maior parte das vendas dos produtos *premium* está concentrada nos países desenvolvidos, no entanto a segunda categoria foi responsável por 72% das vendas no ano de 2010. Esse fato deve-se a consciência dos consumidores em saber que os produtos de massa possuem qualidade equiparável aos produtos de luxo, passando a optar então por cosméticos de custo reduzido. Contudo, as inovações e novas tecnologias são introduzidas no mercado pelas marcas do seguimento de luxo.

ŁOPACIUK e ŁOBODA (2013) finalizam seu trabalho citando algumas tendências de mercado permeiam esse setor e vão influenciar fortemente o sucesso do segmento. Dentre elas, podem se destacar:

- Busca por maior relação custo benefício. Para isso, as empresas do setor devem focar em gerar produtos com maiores prazos de validade, que sejam de fácil aplicação, que possuam maior durabilidade na pele, que sejam armazenadas em embalagens econômicas e retornáveis.
- Necessidade de expansão dos meios de vendas. Com o aumento das transações realizadas pela internet, é imprescindível diversificar os canais de venda, utilizando sites, páginas de relacionamento, aplicativos e *e-commerce* em geral. Além disso, a estrutura de distribuição das compras feitas pela internet deve ser observada. Segundo Hardy (2016), as vendas online tiveram aumento de 38% em 2015 e há previsão de crescimento de 80% nas vendas de produtos de beleza online até 2019.
- Sustentabilidade, logística reversa das embalagens, preocupação com o meio ambiente, disponibilidade de produtos orgânicos. O banimento de testes em animais também é um fator que evidencia a responsabilidade social por parte das empresas.

O último item citado engloba a preocupação que as empresas devem ter ao escolher os insumos e matérias primas. Ao priorizar o consumo de fontes naturais, orgânicos e renováveis, o processo torna-se mais sustentável e ecológico. Nesse contexto, a aplicação de catalisadores biotecnológicos é vantajosa e deve ser estudada sob os mais diferentes aspectos para desenvolvimento de novas tecnologias.

Nos últimos 20 anos, o mercado mundial de beleza tem crescido em média 4,5% ao ano, e tem provado sua habilidade em manter crescimento contínuo e resiliência em condições econômicas desfavoráveis (ŁOPACIUK; ŁOBODA, 2013). A previsão é de que as vendas globais de cosméticos atinjam 675 bilhões de dólares até 2020 (HARDY, 2016).

O Brasil está na 4ª posição dentre os países consumidores de produtos de higiene pessoal, perfumaria e cosméticos, perdendo apenas para Estados Unidos, China e Japão. Dentre os países da América Latina, o Brasil foi responsável por 60% da produção total do setor em 2016 (ABIHPEC, 2016). Estes dados revelam que o setor está em ascensão, então espera-se que o consumo dos insumos desse setor, dentre eles o palmitato de cetila, também seja crescente nos próximos anos.

3.1.2 Ceras e suas aplicações

As ceras são lipídios naturais ou sintéticos de elevado peso molecular com alto valor agregado e alto grau de biodegradabilidade. Na natureza, cumprem uma série de funções biológicas, como por exemplo, na impermeabilização de penas de aves, prevenção de crescimento de agentes patogênicos e entrada microbiana na pele de organismos (GUNSTONE *et al.*, 2007). São industrialmente utilizadas em diversos setores, como para a produção de embalagens alimentícias, giz de cera, tintas para impressora, biolubrificantes, revestimento para madeira, agente antiespumante, vernizes, adesivos e principalmente no setor de cosméticos.

Exemplos notáveis de ceras utilizadas em cosméticos são cera de lótus, cera de abelhas, cera de citrinos, cera de carnaúba, parafina, própolis e goma-laca. Elas atuam como emolientes e protetores da pele. Podem também ser utilizados como aglutinantes e reguladores de viscosidade, sendo a segunda aplicação a mais comum (PAPPAS, 2015).

A experiência do consumidor ao utilizar os cosméticos influencia diretamente na aceitação e na percepção que o cliente tem sobre o produto. Com o objetivo de melhorar as características sensoriais e gerar produtos mais competitivos, pesquisas acerca dos processos de produção têm sido feitas continuamente. Sabe-se que a adição de ingredientes específicos, como ácidos graxos, álcoois e ésteres, interferem nas propriedades de diversos tipos de cosméticos (PAPPAS, 2015).

Dentre as classes de componentes orgânicos usados na produção de cosméticos, os ésteres possuem uma grande gama de aplicação, como em emoliente para cremes, surfactante em shampoos e como fragrância em perfumes, por exemplo, onde a escolha do componente depende das propriedades específicas do éster e da característica que se deseja dar ao cosmético (KHAN; RATHOD, 2015). O óleo mineral e óleos vegetais, quando usados como aditivos, costumam produzir sensação pesada e gordurosa na pele. Os ésteres de ácidos graxos hidrofóbicos (ceras) são fonte de emolientes e aumentam a gravidade específica quando adicionados à fase oleosa. Dessa forma, alteram sua aparência, textura, e fornecem sensação de pele mais leve e mais agradável ao toque se comparado aos cosméticos com adição de óleos (PAYE *et al.*, 2009). Devido a esses fatores, o mercado dos cosméticos destaca-se como um dos principais consumidores do

palmitato de cetila, uma cera atóxica, capaz de prover características específicas aos produtos.

3.1.2.1 Palmitato de Cetila

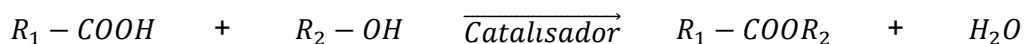
Assim como as outras ceras, o palmitato de cetila pode ser encontrado na forma natural ou pode ser produzido sinteticamente. Nesse caso, provirá da esterificação do álcool cetílico ($C_{16}H_{34}O$) com o ácido palmítico ($C_{16}H_{32}O_2$), sendo assim constituída de 32 carbonos ($C_{32}H_{64}O_2$). É comercializado na forma de cristais brancos ou em pó.

Na natureza, palmitato de cetila é encontrado em grandes quantidades no espermacete. Este por sua vez é encontrado na cavidade cranial de baleias cachalote (*Physeter macrocephalus*), que é a maior dentre as espécies de baleias dentadas. Pode ser encontrado também, porém em menor quantidade, no óleo de gordura das baleias cachalotes. Encontra-se em estado líquido enquanto o animal está vivo, mas tende a solidificar após sua morte. Uma baleia fornece até 226 kg de espermacete. É constituído basicamente de ésteres de ácidos graxos (no mínimo 90% de palmitato de cetila), ácidos graxos livres (0,1% a 0,4%) e álcoois (1% a 1,5%). É solúvel em acetona e álcool quentes, tetracloreto de carbono, clorofórmio, éter e nafta (WARTH, 1956).

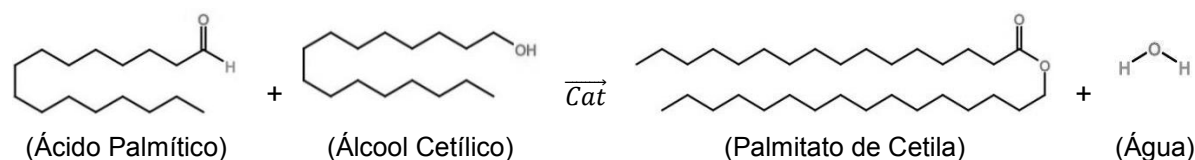
Como a principal fonte natural de obtenção desta cera é cara e de acesso limitado, pois provém de origem animal com caça proibida, a alternativa encontrada foi a produção sintética de palmitato de cetila. (WILLIAMS; SCHIMITT 1996). O palmitato de cetila pode também ser encontrado naturalmente em superfícies de frutas, nas folhas de carnaúba (*Copernicia cerifera*), em colmeias, nos tecidos de corais marinhos, porém em proporções muito menores.

3.1.3 Reações de esterificação

As reações de esterificação são um processo reversível, que geram como produto principal um éster. Caracterizam-se pela reação entre um ácido graxo e um álcool. Este tipo de síntese costuma ser muito lenta quanto processada a temperatura ambiente. No entanto, pode ser acelerada utilizando aquecimento, que pode estar combinado ou não com uso de catalisadores.



No caso da produção do palmitato de cetila, objeto de estudo deste trabalho, a reação de esterificação é dada pela reação a seguir.



Como a água produzida pode promover a reação inversa e hidrolisar o éster, algumas estratégias podem ser aplicadas para que maiores conversões sejam atingidas. Para isso, pode-se deslocar o equilíbrio eliminando um dos produtos da reação. No caso da esterificação, a água pode ser removida alterando a pressão/temperatura do sistema, ou adicionando adsorventes, como sílica, por exemplo. Outra estratégia adotada é a adição de álcool em excesso no sistema, ou seja, aumentando a razão molar entre os reagentes, no entanto o produto gerado precisará ser separado do álcool restante no meio reacional.

3.1.4 Tipos de catálise

Sabe-se que catalisadores são materiais que, quando adicionados a um meio reacional específico, são capazes de reduzir a energia de ativação de uma reação química, aumentando a taxa ou possibilitando reações a temperaturas mais baixas.

A esterificação de ácidos graxos pode ser catalisada por enzimas, ácidos ou organometálicos. Quando a esterificação é catalisada por um ácido, é conhecida como esterificação de Fisher, onde a formação do éster ocorre por adição nucleofílica (SMITH, 2011). O processo industrial convencional de produção de ceras realiza esterificação catalisada por ácidos ou bases fortes, a temperaturas variando entre 150 °C e 240 °C (KHAN; RATHOD, 2015; NILSSON, 2007).

Embora as conversões atingidas com a catálise ácida ou básica sejam elevadas, as altas temperaturas geram produtos de baixa qualidade, contaminados por substâncias que não podem ser destinados a produção de fármacos e cosméticos. Além disso, há maior consumo energético, necessidade de separação do catalisador solubilizado no meio e purificação do produto final. Nesses casos, é necessário neutralizar o ácido restante, além de desodorizar, secar e branquear o produto (NILSSON, 2007).

Esses procedimentos adicionais reduzem o rendimento do processo, além de aumentar o custo devido à compra de reagentes, ao gasto energético e ao número de operações unitárias empregadas. Segundo Nilsson (2007), a quantidade de solventes, resíduos e outros reagentes descartados nos processos convencionais de produção é até cinco vezes maior que os processos que usam catálise enzimática. Dessa forma, as enzimas constituem uma alternativa promissora para contornar esses problemas, pois operam em baixas temperaturas, baixas pressões, e geram produtos de alta pureza (KHAN; RATHOD, 2015).

3.1.4.1 Lipases

Lipases são enzimas que possuem elevado potencial biotecnológico como catalisadores em sínteses orgânicas em meios não aquosos. Catalisam principalmente reações de hidrólise, esterificação, interesterificação, alcoólise, acidólise, utilizando processos simplificados e com altos rendimentos. Essa diversidade faz com que sejam úteis em diversas aplicações industriais, como na produção de alimentos, biodiesel e fármacos (RODRIGUES; FERNANDEZ-LAFUENTE, 2010 e STERGIOU *et al.*, 2013).

Sob condições apropriadas, as enzimas catalisam reações de esterificação e hidrólise. A escolha adequada do tipo de enzima e do substrato, combinada com condições ideais, pode gerar ácidos ou triacilgliceróis específicos. Devido a essa seletividade, é possível obter produtos que seriam difíceis de obter a partir catálise química convencional (GUNSTONE, 1999).

As enzimas comerciais produzidas a partir dos fungos *Rhizomucor miehei* e *Candida antarctica* destacam-se pela grande quantidade de artigos científicos publicados que as utilizam e pela boa aplicabilidade em diversos tipos de sistemas. Essas por sua vez são amplamente usadas como catalisadores para a acilação de álcoois de cadeia média e longa, onde o grupamento acil é proveniente de um ácido graxo, um triglicerídeo ou um éster metílico (GUNSTONE, 1999).

De acordo com o processo químico que se deseja catalisar, pode-se escolher a enzima mais adequada de acordo com a sua forma. É possível encontrar formulações líquidas de lipases, geralmente em soluções aquosas, onde deve-se contabilizar o custo da separação do catalisador homogêneo do meio reacional (STERGIOU *et al.*, 2013). São empregadas também lipases que utilizam a célula

inteira do microrganismo, como no caso de bactérias e fungos que não são purificados ou não passam por pré tratamento. Nessa caso, é necessário levar em conta não só a conversão do substrato, mas também o crescimento do microrganismo, o que torna os processos mais complexos. Por outro lado, os processos enzimáticos costumam ter menor custo por reduzirem despesas associadas à purificação (PRATHER, 2004). Por fim, as lipases imobilizadas em matrizes sólidas também são opção amplamente utilizada de catálise heterogênea, de mais fácil separação. Nesse caso, a imobilização pode ser feita por adsorção, encapsulação ou ligação covalente da enzima à matriz porosa (STERGIOU *et al.*, 2013). Existe um interesse contínuo nos processos que usam enzimas imobilizadas, pois elas podem ser tratadas como catalisadores heterogêneos convencionais, além de facilitarem a aplicação em sistemas contínuos (WITTCOFF *et al.*, 2004).

Sabe-se que as enzimas, principalmente as imobilizadas, possuem custo elevado, o que poderia impactar no preço do produto final. No entanto, as lipases catalisam reações em condições mais brandas, com temperaturas medianas, pH moderado e pressão próxima da atmosférica, o que evita gastos desnecessários com combustíveis, vapor, reatores mais robustos (que seriam necessários para suportar maior pressão e temperatura). Os produtos também costumam ter maior grau de pureza, menor grau de degradação, portanto são mais fáceis de purificar e geram menos custos relacionados à disposição final de reagentes (GUNSTONE, 1999). Esses fatores tornam os processos enzimáticos amigáveis ao meio ambiente, pois geram menos resíduos tóxicos, reduzem o consumo de água e reagentes, diminuindo o impacto ambiental do processo.

Nos últimos anos as lipases provenientes de plantas tem se tornado atraente aos pesquisadores, pois há ainda uma grande diversidade de plantas a serem estudadas que podem apresentar especificidade a certos substratos (CAVALCANTI *et al.*, 2007). Na maioria dos casos a lipases se encontram em sementes oleaginosas que, como geralmente são encontradas em grande disponibilidade, se tornam uma fonte de matéria-prima de baixo custo.

As sementes de mamona (*Ricinus communis*) tem se mostrado importante fonte de obtenção de lipase, pois, em comparação com outras sementes oleaginosas onde a lipase é ativada somente durante a germinação (VILLENEUVE, 2003), a semente de mamona apresenta lipase ativa também na fase dormente (CAVALCANTI *et al.*, 2007; SRIVASTAVA *et al.*, 2016). Outros fatores que tornam a

mamona atrativa são o fato de poder ser encontrada e cultivada em todos os países de clima temperado do mundo (MADANKAR *et al.*, 2013), e de não ser destinada a produção de alimentos, o que aumenta ainda mais sua disponibilidade e reduz seu custo.

Em casos em que há diferentes maneiras de sintetizar um único produto, a pesquisa científica deve focar em esclarecer qual a metodologia e o tipo de catalisador mais viável sob aspectos técnicos, econômicos e ambientais e fornecer alternativas para a produção industrial em larga escala.

3.1.5 Solventes

Solvente é todo líquido capaz de solubilizar uma amostra, chamada de soluto. Ao se dissolver certo componente, a energia necessária para romper as interações entre as moléculas do próprio soluto são substituídas pelas interações geradas entre o soluto e o solvente (SMITH, 2011).

A maioria dos componentes orgânicos apolares, como os ésteres, são solúveis apenas em solventes orgânicos. Um componente orgânico só é solúvel em água (polar) se tiver um grupo funcional polar, ou seja, um grupo funcional que contenha ligações –O ou -N, para cada cinco átomos de carbono da molécula. Essas ligações são capazes de interagir com o hidrogênio da molécula de água, solubilizando a amostra orgânica (SMITH, 2011).

Pesquisas na área de catálise enzimática buscam estabelecer qual a melhor condição para maior atividade catalítica, que é amplamente afetada pela escolha do solvente. Segundo Bezbradica *et al.* (2017) e Stergiou *et al.* (2013), uma grande variedade de componentes orgânicos e suas misturas foram testados, e a escolha do melhor solvente depende da enzima, das propriedades físico químicas dos substratos utilizados, da força iônica do solvente e da temperatura do sistema.

A principal preocupação da utilização de solventes está relacionada com a sua toxicidade. Conforme citado no item 3.1.2, os ésteres são utilizados principalmente em indústrias farmacêuticas, alimentícias e cosméticas, o que exige produtos com alta pureza e livres de qualquer contaminação, não havendo tolerância nem mesmo para pequenas quantidades de solvente. A alternativa viável encontrada é conduzir a reação em sistema livres de solvente. Em alguns casos, pode ser necessário utilizar excesso de um dos substratos, para que ele atue tanto

como reagente, como solvente para o meio. Mesmo nesses casos, a eliminação do processo de separação do solvente torna o processo mais econômico e mais seguro para suas destinações. Além disso, Stergiou *et al.* (2013) afirmam que sistemas livres de solvente são mais fáceis de controlar e são mais vantajosos, pois como há menor quantidade de componentes envolvidos, é possível usar maiores concentrações de substratos, o que também contribui para tornar o processo mais econômico.

3.2 ESTADO DA ARTE

3.2.1 Catálise não enzimática

Com o aumento da comercialização dos produtos derivados de ésteres de ácidos graxos de cadeia longa, há crescente interesse em produção sintética destes componentes. Focados nisso, muitos cientistas publicaram estudos destinados a esse tema, englobando as mais diversas maneiras de operação, a maioria objetivando a otimização do processo e minimização de custos totais.

A catálise ácida é um método bastante difundido e eficiente de catálise de reações de esterificação, aplicado na síntese de ésteres de cadeia curta, geralmente para produção de biodiesel. Esse sistema é muito empregado no pré-tratamento de óleos com alto teor de acidez, onde a catálise ácida promove a esterificação dos ácidos presentes no óleo, gerando ésteres de biodiesel antes do envio do óleo para transesterificação (CANAKCI; VAN GERPEN, 2001; GUPTA *et al.*, 2016; JAIN; SHARMA, 2010)

A catálise ácida homogênea foi utilizada para síntese do éster de cadeia longa oleato de oleíla (AL-ARAFI; SALIMON, 2012). O ácido sulfúrico mostrou-se o mais eficiente dentre os diversos ácidos testados, gerando 93,9% de conversão em 5 horas de reação à 90 °C.

Fugindo dos métodos convencionais de catálise, que são basicamente catálises ácidas/básicas e catálise enzimática, pesquisas foram publicadas buscando alternativas para a síntese de ésteres de cadeia longa. Os líquidos iônicos, por exemplo, embora ainda pouco explorados para esse fim, foram utilizados na esterificação de álcool oleílico com ácido oleico (AL-ARAFI; SALIMON, 2011) e na esterificação de álcool cetílico com ácido palmítico (SUNITHA *et al.*,

2007). Os líquidos iônicos empregados são classificados como ácidos de Lewis, e a principal vantagem é que atuam como catalisador e como solvente simultaneamente. Além disso, são não inflamáveis, possuem estabilidade térmica e podem ser recuperados, o que os torna amigáveis ao meio ambiente. Alguns líquidos iônicos são imiscíveis no meio reacional, o que gera equilíbrio líquido-líquido ao final da reação, e facilita sua recuperação (SUNITHA et al., 2007).

Outro exemplo de catalisador alternativo é uma preparação suportada do sal inorgânico oxidoreto de zircônio, que foi testada como catalisador na síntese de diversos ésteres de cadeia longa. Empregando temperaturas acima de 160 °C, as conversões obtidas foram próximas de 100% para a maioria dos ésteres (MANTRI et al., 2005).

Os métodos alternativos de catálise citados, embora forneçam bons rendimentos, exigem excesso de um dos reagentes e consomem grande quantidade de catalisador. Preparação, ativação e suporte dos catalisadores também podem gerar custos e mão de obra extra no processo. No caso dos catalisadores inorgânicos, as altas temperaturas geram produto de menor pureza e maior grau de degradação.

3.2.2 Catálise enzimática

3.2.2.1 Lipases de sementes

A utilização de sementes oleaginosas como catalisadores tem sido amplamente estudada por apresentar vantagens ambientais e econômicas se comparada com as enzimas comerciais. Como há preferência para que sejam utilizadas sementes não comestíveis, a mamona (*Ricinus communis*) tem sido foco de diversos autores.

Villeneuve et al. (2005) fizeram estudo comparativo entre lipases comerciais provenientes de mamão (*Carica papaya*) e lipase de semente de mamona. Para o pré-tratamento, as sementes de mamona foram moídas com acetona, a suspensão foi filtrada a torta retida do filtro foi lavada com acetona, e o óleo residual foi extraído em Soxhlet durante 8 horas. Ao avaliar o grau de esterificação, o resultado obtido foi de aproximadamente 6% para o mamão e 3% para a mamona, indicando que as

enzimas provenientes de plantas são ineficientes para catalisar a esterificação de esteróis.

Tüter (1998) testou a utilização das sementes de mamona descascadas e moídas diretamente na esterificação entre ácidos graxos e glicerol com objetivo de produzir triglicerídeos. Sem realizar nenhum pré-tratamento químico nas sementes, nenhuma conversão significativa de ácido em triglicerídeos pôde ser observada. Ao aplicar pré-tratamento de moagem, incubação com pH igual a 4 durante 4 horas e secagem, o teor de triglicerídeos no produto atingiu 32%.

A aplicação das sementes de mamona também foi eficiente na catálise de reações de hidrólise de óleos vegetais no estudo de Srivastava e colaboradores (2016). As sementes em estado dormente forneceram 72,3% de taxa de hidrólise de óleo de rícino em sistema com pH controlado de 4,8, a 45 °C em 120 minutos de reação. Ao utilizar semente germinada nas mesmas condições, a taxa de hidrólise foi de apenas 4,03%. Esse estudo revela a capacidade do uso de sementes de mamona sem necessidade de germinação. Esse comportamento ocorre pois a mamona apresenta dois tipos de lipases, sendo que uma é associada aos corpos lipídicos e é ativa somente na fase dormente das sementes e em pH ácido. Dessa forma é dita uma lipase ácida e capaz de hidrolisar triglicerídeos com máxima atividade em pH entre 4,2 e 5. O segundo tipo de enzima é associada ao retículo endoplasmático e é inativa na fase dormente das sementes. É ativa em pH alcalino com atividade ótima em pH em torno de 9, agindo apenas sobre monoglicerídeos (SRIVASTAVA et al., 2016).

3.2.2.2 Lipases de microrganismos

A aplicação das enzimas é uma das melhores alternativas para contornar os problemas relacionados a catálise convencional. Em muitos trabalhos científicos, os autores optaram por utilizar solventes orgânicos apolares.

A aplicação de diversos solventes orgânicos para a síntese de oleato de oleíla, catalisada pela lipase *Novozym 435*, foi feita com objetivo de encontrar o mais eficiente, pois a polaridade de solvente afeta a atividade de enzima. Benzeno, tolueno, hexano, heptano, nonano e hexadecano foram testados e foi observado que a conversão da reação foi basicamente a mesma para todos os solventes,

alcançando conversões acima de 90% em 60 minutos de reação à 37 °C. (RADZI *et al.*, 2005).

O hexano é o solvente mais utilizado devido a sua polaridade, capacidade de solubilizar diversos ácidos carboxílicos, álcoois de cadeia longa e ésteres, além de possuir baixo ponto de ebulição, o que auxilia na sua separação. Esse solvente foi empregado na produção de octanoato de cetila (KUO *et al.*, 2012), para a produção de palmitato de cetila (ISONO *et al.*, 1995), para a produção de 2-etilhexanoato de cetila (CHEN *et al.*, 2011) ou para 20 outros ésteres de cadeia longa (GUNCHEVA; ZHIRYAKOVA, 2008). Ganguly e Nandi (2015) utilizaram iso-octano como solvente para a esterificação de ácido adípico e ácido sebácico com docosanol, no entanto a conversão máxima alcançada foi de apenas 78,2%.

Buscando por processos menos agressivos ao meio ambiente e com produtos livres de contaminação, surgiu uma demanda para trabalhos científicos que utilizam sistemas livres de solvente. Os principais artigos encontrados na literatura referente a sistemas livres de solvente estão na TABELA 3.1.

A síntese de oleato de cetila foi realizada utilizando lipases de *Candida antactica* em batelada em sistema livres de solvente (DENG *et al.*, 2011; GARCIA *et al.*, 2000). Deng *et al.* (2011) obtiveram 94% de conversão operando com reator aberto, com adição de sílica para remoção da água, em temperatura branda de 40 °C, porém o tempo de reação necessário para obter essa conversão foi de 10 horas. Garcia *et al.* (2000) ficaram abaixo dos 90% de conversão, mesmo empregando vácuo de 8000 Pa para deslocamento do equilíbrio e temperatura de 80 °C. A estratégia de conduzir a reação vácuo também foi aplicada na esterificação de ácido ricinoleico com álcool cetílico, o que reduziu de 3,6 mg KOH/g para 1,98 mg KOH/g a acidez final na condição de equilíbrio, no entanto a influência do vácuo na cinética foi pouco significativa (MONTIEL *et al.*, 2015). Esse resultado também foi obtido para a síntese de palmitato de cetila, onde o vácuo de 21,3 kPa aumentou a conversão de equilíbrio de 97,2% para 98,5%, porém sem influenciar na cinética (SERRANO-ARNALDOS *et al.*, 2016). Nesses casos, é preciso avaliar se o custo relativo a geração do vácuo compensa os ganhos com aumento de conversão. Embora o vácuo remova a água do sistema e forneça produto de maior pureza, a sua operação é mais dispendiosa e requer reatores mais robustos.

Catalisadores enzimáticos preparados a partir de fermentação em estado sólido também foram empregados na síntese de oleato de oleíla em sistema livre de

TABELA 3.1 - ARTIGOS REFERENTES A ESTERIFICAÇÃO EM BATELADA EM SISTEMA LIVRE DE SOLVENTE.

Referência	Reator	Reagentes	Catalisador	Condição Ótima	Reuso Enzima	Observações
Serrano-Arnaldos <i>et al.</i> , 2016	Atmosférico: batelada Vácuo: Parr 5101	Álcool Cetílico + Ácido Palmítico/ Esteárico/ Mistúrico/ Láurico	Novozym 435 [®]	80 °C (para palmitato de cetila); 200 min; 350 rpm; RM ^a :1:1 21,3 kPa; 98,5% ^c 2,5% catalisador ^d	2 ciclos sem perder atividade	Vácuo apenas afetou a conversão (de 97,2% para 98,5%), porém não influenciou na cinética. Custo para gerar vácuo pode não compensar o ganho na conversão. Reator à vácuo gera produto mais puro.
Deng <i>et al.</i> , 2011	Batelada: aberto e fechado com rolha (com adição de sílica)	Ácido Oleico + Álcool Cetílico	<i>Candida</i> sp. 99-125	Reator aberto: 40 °C; 10 horas; 170 rpm Catalisador: 10 % (m/m ácido) RM ^a : 0,9:1; 94% ^c	2 ciclos sem perder atividade	Faz <i>scale-up</i> para reator de 1 litro: Tempo de equilíbrio maior no reator de 1 litro (>24 h)
Garcia <i>et al.</i> , 2000	Batelada: frasco com aletas em banho termostático.	Ácido Oleico + Álcool Cetílico	Novozym 435 [®]	80 °C; 2 horas; 700 rpm; 7% catalisador ^d 60 mmHg; 90% ^c	Usa a mesma carga de catalisador em todas as reações.	Negligencia transf. de massa após testar três velocidades (500, 700 e 1200 rpm). Estudou inibição por presença de excesso de álcool, excesso de ácido e produto no início da reação.
Lopes <i>et al.</i> , 2011	Batelada: tubo de ensaio fechado de 60 ml com 10 esferas de vidro de 4 mm.	Ácido Oleico + Álcool Oleílico	Lipase de <i>Rhizopus</i> sp. CBMAI 1127 e <i>Lipozyme</i> TL IM [®]	40 °C ; 120 min; 130 rpm Para NC: RM ^a : 2:1; 93,1% ^c 9,8% catalisador ^d : <i>Lipozyme TL IM</i> [®] : RM ^a : 2:1 - 3:1 7% - 9% catalisador ^d ; 94,2% ^c	-	Preparação da lipase não comercial por fermentação em estado sólido. A enzima não comercial se mostrou eficiente, com altas conversões em curtos períodos de tempo.
Petersoon <i>et al.</i> , 2007	Batelada: Reator de 1 L. Controle de atividade de água (borbulhamento de ar seco ou úmido)	Ácido Palmítico + Álcool Cetílico	<i>Candida</i> <i>antarctica</i> (faz própria imobilização) e Novozym 435 [®]	65 °C; RM ^a : 1:1 Novozym 435 [®] : 120 horas; a _w ^b : 0,02; 99% ^c ; 0,2 g/mol ^e <i>Candida antarctica</i> : 30 horas a _w ^b : 0,75; 99% ^c ; 4 g/mol ^e	-	Controle da atividade de água por adição de ar seco ou úmido. Branco de reação atingiu 20% de conversão em 22h e 73% após 192h.
Montiel <i>et al.</i> , 2015	Aberto: Vidro 200 ml. Vácuo: Parr 5100 de 100 ml	Ácido Ricinoleico + Álcool Cetílico	<i>Lipozyme</i> [®] <i>CalB</i> L e Novozym 435 [®]	70 °C; 350 rpm; RM ^a : 1:1; 2,4% - 9,1% catalisador Vácuo: 60 °C; 213 hPa 1 g catalisador; 98% ^c	3 ciclos sem perder atividade	Vácuo não afeta a cinética, apenas aumenta a conversão de equilíbrio Faz imobilização da <i>CalB</i> em resina aniônica, que apresenta mesma cinética e conversão de equilíbrio que Novozym 435 [®] .
Wehtje <i>et al.</i> , 1999	Batelada: controle de atividade de água Contínuo: Tubo de PVC e silicone	Álcool Cetílico + Ácido Palmítico	Novozym 435	Tempo: 400 min (batelada) Fluxo: ~ 0 a 0,16 g/min (contínuo); 99,1% ^c ; a _w ^b : 0,05 RM ^a :1:1; 500 rpm; 65 °C	Contínuo: nenhuma perda após 1 semana de operação	Rendimento é maior conforme a _w diminui. Reação com reator aberto corresponde a a _w =0,05.

^a razão molar (álcool:ácido); ^b atividade de água; ^c conversão; ^d quantidade de catalisador (massa catalisador/massa total); ^e quantidade de catalisador (g catalisador/ mol substrato). FONTE: A autora (2017).

solventes. Embora a preparação do catalisador seja uma etapa dispendiosa e delicada, é possível obter conversões acima de 93% em temperaturas baixas (40 °C) em tempos curtos de reação (120 minutos) (LOPES *et al.*, 2011).

O palmitato de cetila, produto de interesse deste trabalho, também foi produzido em sistemas livres de solvente em três trabalhos encontrados na literatura. Petersoon *et al.* (2007) tinham o objetivo de otimizar a atividade enzimática em função da quantidade de água presente no meio. Para isso, utilizaram reator com borbulhamento de ar seco ou úmido para monitoramento contínuo do processo e obtiveram 99% de conversão em 120 horas de reação a 65 °C e atividade de água $a_w = 0,02$. Serrano-Arnaldos *et al.* (2016), citados anteriormente, sintetizaram o palmitato de cetila em proporção estequiométrica, a 80° C e 21,3 kPa, e obtiveram 98,5% de conversão em 200 minutos de reação. Wehtje *et al.* (1999) sintetizaram o palmitato de cetila em reator contínuo de tubo de PVC (impermeável a água) e silicone (permeável a água) com objetivo de analisar a atividade de água do sistema, obtendo conversão de 99% com atividade de água de 0,05 que corresponde ao reator aberto. Nos três últimos trabalhos citados foi utilizada a enzima comercial *Novozym 435*[®] como catalisador para suas reações e nenhuma modelagem cinética foi proposta pelos autores.

3.2.3 Modelagem cinética

Os modelos cinéticos tem por objetivo descrever matematicamente o comportamento de reações químicas. Deve ser utilizado preferencialmente na faixa de condições que foram utilizadas no momento aquisição de dados experimentais e o ajuste dos parâmetros do modelo proposto deve ser suficientemente bom para que o modelo cinético seja capaz de descrever com confiança o comportamento real.

O principal desafio ao realizar a modelagem cinética é a obtenção de um modelo robusto, capaz de prever com confiança a variação de maior número de parâmetros de reação possíveis, para que possa ser utilizado com menos restrições e nas mais distintas condições.

Alguns trabalhos podem ser encontrados na literatura referentes à produção de ceras a partir de reações de esterificação e transesterificação catalisadas por lipases imobilizadas. É possível observar algumas limitações referentes ao comportamento das reações enzimáticas em diferentes temperaturas. Para reações

enzimáticas, sabe-se que a taxa de reação aumenta em média duas ou três vezes a cada aumento de 10 °C de temperatura. Para temperaturas mais altas, no entanto, esse aumento se torna lento, atingindo um máximo e decaindo novamente devido à desativação térmica irreversível da enzima (BISSWANGER, 2002). Esse comportamento enzimático de estabilização e decaimento da taxa de reação, até onde se sabe, não foi completamente elucidado em procedimentos experimentais e em modelagens cinéticas pelos trabalhos disponíveis na literatura.

Garcia *et al.* (2000) realizaram experimentos de esterificação entre ácido oleico e álcool cetílico com temperatura limitada até 80 °C para evitar desativação enzimática, dessa forma o modelo matemático proposto baseado no mecanismo de King-Altman não foi capaz de prever o comportamento da reação para condições onde a taxa de reação é constante ou decrescente.

Nos resultados experimentais obtidos por Rani e seus colaboradores (2015) para a esterificação entre decanol e ácido oleico, entre 35 °C e 50 °C, foi possível notar que não há diferença significativa entre as curvas cinéticas de 45 °C e 50 °C. Isso indica que a região onde a taxa é constante foi obtida experimentalmente, porém a modelagem cinética descrita pela equação de Arrhenius não apresentou bom ajuste e a conversão foi subestimada para temperaturas acima de 40 °C.

A faixa de temperatura adotada para a esterificação entre glicerol e ácido octanóico foi suficientemente grande (30 °C a 80 °C) para observar o início da região onde a temperatura começa a apresentar pouca influência na taxa de reação, mais especificamente na faixa entre 70 °C e 80 °C (MORE *et al.*, 2017). No entanto, a modelagem cinética utilizando equação de Arrhenius para prever a influência da temperatura gerou ajuste insatisfatório justamente para as maiores temperaturas, com coeficiente de ajuste (r^2) entre 0,6 – 0,7.

Embora tenham realizado a modelagem cinética e estimado os parâmetros cinéticos, os trabalhos de Tomke e Rathod (2016) e de Khan e seus colaboradores (2015) não analisaram a influência da temperatura. Nos dois trabalhos apenas a concentração dos reagentes foi variada nos experimentos utilizados para modelagem e não foi explicitada qual a temperatura utilizada nos experimentos.

3.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Motivados pela baixa disponibilidade do palmitato de cetila na natureza e crescente demanda do mercado, esse foi o produto escolhido para síntese no desenvolvimento deste projeto.

A catálise ácida é o método mais comum e amplamente estudado para catalise de reações de esterificação. Como a catálise ácida foi aplicada com sucesso na síntese da cera oleato de oleíla (AL-ARAFI; SALIMON, 2012), espera-se que ela seja eficiente também como catalisador para geração de outras ceras sintéticas.

O palmitato de cetila é um éster que também pode ser produzido sinteticamente a partir da catálise enzimática em sistemas livres de solvente. Lipases proveniente de sementes oleaginosas, principalmente a semente de mamona tem sido empregada como catalisador de reações de esterificação (TÜTER, 1998; VILLENEUVE et al., 2005), transesterificação (VILLENEUVE et al., 2005) e hidrólise (SRIVASTAVA et al., 2016), o que mostra o grande potencial de aplicação desta enzima como catalisador. No entanto, os processos de preparação e pré-tratamento da semente ainda são dispendiosos e contam com muitos processos adicionais.

Estudos publicados na literatura revelam que é possível a produção do éster em sistemas livres de solvente empregando enzimas comerciais imobilizadas, com temperaturas abaixo de 80 °C, em tempos inferiores a 3 horas, com conversões acima dos 90%, como pode ser visto na TABELA 3.1. Além disso, a utilização de proporções estequiométricas entre os reagentes também foi possível, o que gera produto com alta pureza, eliminando a necessidade de purificação ao final do processo. A aplicação de lipases de *Candida antactica* foi a opção adotada por diversos autores, o que revela a necessidade de expansão dos tipos de catalisadores empregados. A enzima comercial *Lipozyme RM IM*[®] (lipase imobilizada 1,3 específica de *Rhizomucor miehei*) foi escolhida como catalisador para a síntese do palmitato de cetila nesse projeto, por se mostrar eficiente em estudo realizado para produção de ceras similares em *n*-hexano, atingindo conversão próxima a 95% (KUO et al., 2012).

Nesse contexto, o desafio era conduzir a síntese de palmitato de cetila em sistema livre de solvente aplicando diferentes catalisadores. Inicialmente foi empregada a catálise ácida convencional para fins comparativos com a catálise

enzimática. Na sequência, foram testadas sementes oleaginosas de mamona, quinoa, girassol, abóbora, soja e grão de bico como fonte de lipase. A enzima comercial imobilizada *Lipozyme RM IM*[®] também foi utilizada como catalisador, onde as condições ótimas de operação foram obtidas. A partir dos dados levantados, foi desenvolvida a modelagem cinética baseada em mecanismo para reações enzimáticas e os parâmetros foram estimados para que o modelo ajuste aos comportamento experimental. Adicionalmente, foi avaliada a possibilidade de recuperação do catalisador do meio reacional e seu reuso, obtendo assim informações sobre a desativação enzimática em função do número de ciclos.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

O presente capítulo apresenta os materiais, equipamentos e a metodologia experimental utilizados para estudo cinético e otimização da produção de palmitato de cetila.

4.1 MATERIAIS

Os reagentes álcool cetílico (99% - CAS 36653-82-4) e ácido palmítico (98% - CAS 57-10-3) foram adquiridos da empresa Alphatec e Sigma Aldrich, respectivamente e foram utilizados como reagentes na síntese do palmitato de cetila. O etanol (99,8% - CAS 64-17-5) utilizado para diluição da amostra de titulação e o álcool *n*-propílico (99,8% - CAS 71-23-8) utilizado para medida padrão de atividade enzimática foram adquiridos da empresa Neon (São Paulo).

O ácido sulfúrico 95-97% (CAS 7664-93-9) utilizado como catalisador foi adquirido da empresa Merck – Alemanha. A enzima comercial *Lipozyme RM IM*[®] foi adquirida da empresa *Novozymes* - Dinamarca e mantida sob refrigeração até seu uso.

As sementes de mamona (*Ricinus communis* L.) foram compradas da empresa BRSeeds Produção e Comércio de Sementes Ltda. – Araçatuba, Brasil (cultivar IAC Guarani lote 03/2015). As sementes de abóbora (*Cucurbita moschata*), soja (*Glycine max*), grão de bico (*Cicer arietinum*), quinoa (*Chenopodium quinoa*) e girassol (*Helianthus annuus*) foram adquiridas no comércio do Mercado Municipal de Curitiba – PR (Brasil).

O álcool *n*-propílico 99,95% (CAS 71-23-8) da Neon (São Paulo – Brasil) e o ácido láurico ≥98% (CAS 143-07-7) da Sigma Aldrich - Malaysia foram utilizados como reagentes nas reações para medida padrão de atividade das sementes.

O *n*-hexano P.A. (CAS 110-54-3) utilizado para filtração do catalisador e a acetona 99,6% (CAS 67-64-1) foram adquiridos da empresa Neon, Suzano-SP (Brasil). Os demais reagentes foram utilizados em grau analítico e utilizados como recebidos.

4.2 EQUIPAMENTOS

Os principais equipamentos utilizados para os procedimentos são:

- Célula de vidro encamisada
- Banho termostático *Nova Ética 521 – 5D*
- Chapa para agitação magnética *IKA C-MAG HS 4*
- Barras magnéticas
- Agitador mecânico *IKA RW20 D S32*
- Hélice de duas pás 1,45 cm x 0,52 cm
- Balança analítica *BEL Engineering UMark 250A*
- Bureta automática *Titrette Class A Precision*
- Solução de alcoólica de fenolftaleína (1% m/m)
- Solução de NaOH 0,1M

4.3 METODOLOGIA EXPERIMENTAL

4.3.1 Estudo de tipos de catalisadores

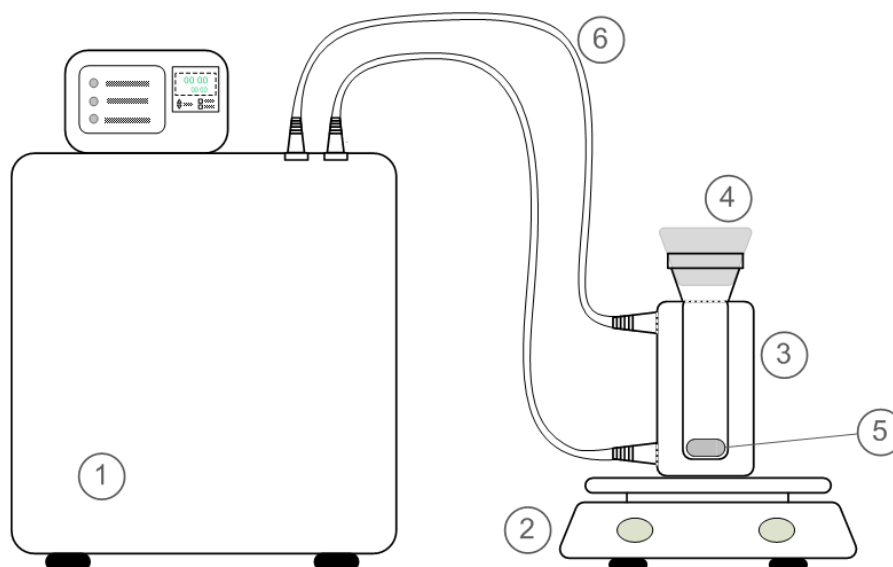
Para o levantamento de dados cinéticos foram realizados experimentos de síntese de palmitato de cetila em batelada. Um reator de vidro encamisado de aproximadamente 25 ml foi conectado ao banho termostático *Nova Ética 521 – 5D* que utiliza água como fluído térmico. A agitação mecânica era realizada através de barra magnética (0,87 cm x 1,95 cm) e o reator foi mantido fechado com rolha durante todo o período da reação. A FIGURA 4.1 e a FIGURA 4.2 apresentam esquema do aparato experimental e detalhamento dos equipamentos, respectivamente.

Assim que a temperatura do banho termostático atingia o valor desejado, o álcool cetílico e o ácido palmítico eram adicionados ao reator (aproximadamente 3,5 g de massa total) e a agitação era ajustada. A partir do momento em que o sistema se encontrava completamente líquido, o catalisador era adicionado e o tempo de reação era iniciado.

A reação era encerrada ao retirar amostras em triplicata de cerca de 0,3 gramas e adicioná-las a etanol a temperatura ambiente. Ao entrar em contato com o etanol em temperatura abaixo do ponto de fusão dos produtos e reagentes

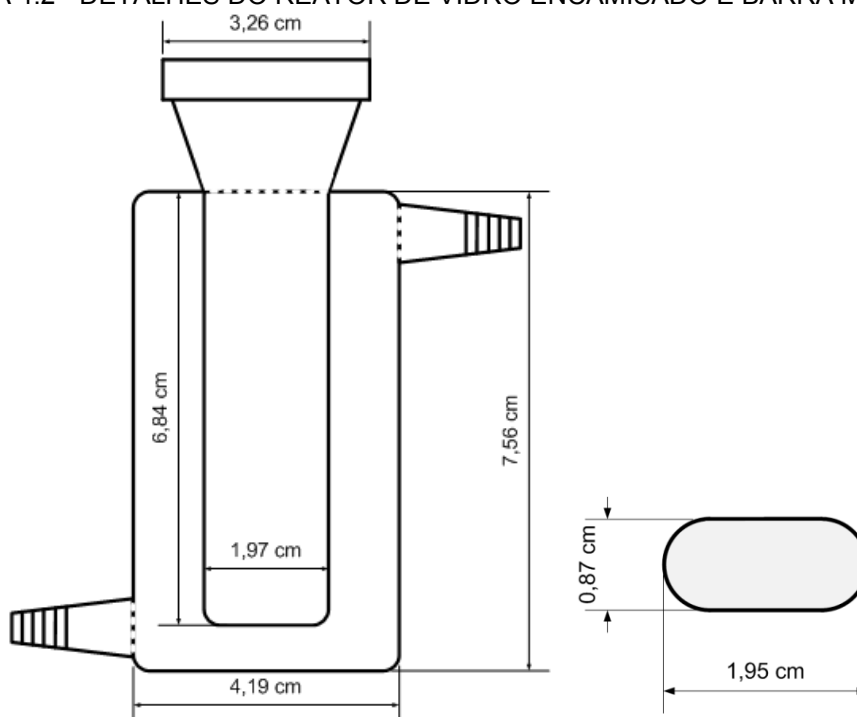
presentes no meio, a amostra solidifica, encerrando a reação. As amostras eram então tituladas para determinação da quantidade de ácido graxo presente no meio reacional. O planejamento experimental e as condições adotadas para cada tipo de catalisador utilizado serão descritos nos itens a seguir.

FIGURA 4.1 - ESQUEMA DO EQUIPAMENTO PARA REAÇÃO EM BATELADA COM AGITAÇÃO MAGNÉTICA.



1-Banho termostático. 2-Chapa de agitação. 3-Reator. 4-Rolha. 5-Barra magnética para agitação. 6-Mangueiras. Sem escala. FONTE: A autora (2017).

FIGURA 4.2 - DETALHES DO REATOR DE VIDRO ENCAMISADO E BARRA MAGNÉTICA.



FONTE: A autora (2017).

4.3.1.1 Catálise Ácida

Nos experimentos que foram conduzidos com ácido sulfúrico como catalisador o objetivo era analisar o comportamento da reação frente a um método amplamente conhecido e eficiente para catálise de reações de esterificação. Dessa forma, duas curvas cinéticas foram obtidas variando apenas a concentração de ácido sulfúrico, mantendo todos os outros parâmetros constantes, conforme TABELA 4.1. As condições de temperatura e razão molar foram baseadas no trabalho de Al-Arafi e Salimon (2012) que também realizaram catálise com ácido sulfúrico na produção de oleato de oleíla.

TABELA 4.1 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA REAÇÕES COM CATÁLISE ÁCIDA.

Análise	Agitação (rpm)	% Catalisador (m/m substratos)	RM (álcool:ácido)	T (°C)	Tempo
CA1	720	0,26	1:1	80	15min, 30min, 1h, 2h, 5h
CA2	720	1,0	1:1	80	15min, 30min, 1h, 2h, 3h, 4h, 5h

Como a reação catalisada por ácido sulfúrico é homogênea, os experimentos foram conduzidos de maneira ininterrupta, ou seja, após o início da reação pequenas amostras eram coletadas em cada tempo de amostragem. Considerando que a alíquota retirada é homogênea, a concentração de catalisador no meio não muda, e apenas o volume reacional é ligeiramente reduzido.

4.3.1.2 Catálise por Sementes

A aplicação de sementes oleaginosas foi testada primeiramente na reação de esterificação entre ácido láurico e *n*-propanol. Essa é uma reação padrão utilizada para medida de atividade de catalisadores enzimáticos e pode ser utilizada para fins comparativos entre diversos catalisadores. As condições adotadas são baseadas na metodologia por Oliveira *et al.* (2006), conforme indicado na TABELA 4.2. Como a mistura entre álcool *n*-propílico e ácido láurico é líquida a temperaturas mais baixas, um teste foi conduzido à 35 °C (análise CS2) para avaliar se a temperatura influencia de alguma forma na atividade enzimática ou se causa algum efeito de desativação térmica.

Para os testes que utilizam a semente de mamona, a casca foi manualmente removida pois diversos trabalhos reportam que a atividade enzimática está presente

na parte interna da semente (SRIVASTAVA et al., 2016; TÜTER, 1998). Como o objetivo é utilizar sementes com a menor quantidade de pré-tratamento possível para tornar o processo mais econômico e rápido, todas as sementes foram testadas em sua fase dormente, antes da germinação. Apenas o processo físico de moagem das sementes foi utilizado para redução do tamanho da partícula e aumento da superfície de contato com os reagentes.

TABELA 4.2 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA TESTE DE ATIVIDADE CATALÍTICA DE SEMENTES OLEAGINOSAS NA SÍNTESE DE LAURATO DE PROPILA.

Análise	Semente	% Sólidos (m/m substratos)	RM (álcool:ácido)	Temperatura (°C)	Tempo (h)
CS1	Mamona	30	3:1	60	1
CS2	Mamona	30	3:1	35	1
CS3	Abóbora	30	3:1	60	1
CS4	Quinoa	30	3:1	60	1
CS5	Soja	30	3:1	60	1
CS6	Girassol	30	3:1	60	1
CS7	Grão de Bico	30	3:1	60	1

Após realização do teste preliminar de síntese de laurato de propila, a semente de mamona foi aplicada na produção de palmitato de cetila para verificação de sua eficácia na produção de ésteres de cadeia longa. As condições utilizadas estão descritas na TABELA 4.3. Diferentes condições de temperatura, tempo e quantidade de sólidos foram empregadas com objetivo de encontrar as condições mais favoráveis para o sistema. Como as lipases são termo sensíveis, análises foram feitas na temperatura de 35 °C, porém nessa condição os reagentes encontram-se em fase sólida. Dessa forma, apenas nesses casos, o *n*-hexano foi utilizado como solvente para atestar a funcionalidade do catalisador.

Três diferentes preparação foram aplicadas às sementes de mamona descascadas. A primeira consistiu na moagem para redução do tamanho da partícula (análises CM1 a CM3); no segundo pré tratamento a semente moída foi deixada durante 2 horas em estufa a 60 °C para remoção da umidade (análises CM4 e CM5). A terceira preparação (análises CM6 e CM7) consistiu na extração de óleo presente em 30 gramas de sementes moídas por agitação a 4 °C em 120 ml de acetona anidra durante 4 horas, seguida de filtração à vácuo em funil de Büchner em papel filtro qualitativo. O sólido branco retido foi deixado durante 24 horas em

temperatura ambiente para evaporação do solvente, e então foi peneirado antes de ser utilizado.

TABELA 4.3 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA TESTE DE ATIVIDADE CATALÍTICA DA MAMONA.

Análise	Preparação Mamona	% Sólidos ^a	RM (álcool:ácido)	T (°C)	Tempo (h)	% n-hexano ^b
CM1	Moagem	50	2:1	60	2	-
CM2	Moagem	30	1:1	60	30	-
CM3	Moagem	30	1:1	35	6	220
CM4	Moagem + Estufa 60°C	50	2:1	60	1	-
CM5	Moagem + Estufa 60°C	50	2:1	60	3	-
CM6	Moagem + Extração óleo	20	1:1	35	2	100
CM7	Moagem + Extração óleo	20	1:1	35	7	100
CM8	Moagem + Extração óleo	10	1:1	35	2	100
CM9	Moagem + Extração óleo	10	1:1	35	7	100
CM10	Moagem + Extração óleo	10	1:1	30	6	200

^a Quantidade de sólidos para teste de atividade catalítica (massa sólidos/massa substratos);

^b Quantidade de solvente (massa n-hexano/massa substratos).

4.3.1.3 Ausência de Catalisador – Branco de Reação

Para verificação da hipótese de catálise térmica da reação na ausência de catalisador, duas análises foram realizadas em diferentes condições para verificação do progresso da reação, conforme indicado na TABELA 4.4.

TABELA 4.4 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA REAÇÕES NA AUSÊNCIA DE CATALISADOR.

Análise	Agitação (rpm)	% Catalisador (m/m substratos)	RM (álcool:ácido)	T (°C)	Tempo
BR1	480	-	2:1	60	1h, 2h
BR2	480	-	1:1	80	1h, 2h

4.3.1.4 Catálise por Enzima Comercial Imobilizada

O planejamento experimental foi composto de 13 curvas cinéticas ao total, conforme condições descritas na TABELA 4.5.

Como a transferência de massa costuma ser um fator limitante em sistemas onde o catalisador é suportado e os reagentes possuem alta viscosidade, esse é um parâmetro de grande importância na síntese do palmitato de cetila. Um valor fixo de agitação deve ser previamente definido, pois o aumento da velocidade de agitação pode, por um lado, favorecer a cinética da reação ao reduzir a resistência à transferência de massa do sistema, mas por outro lado, pode causar fragmentação da enzima e de seu suporte, impossibilitando sua recuperação e reuso. Para isso, curvas cinéticas a 60 °C, 1,7% de catalisador em relação à massa total do sistema (ácido palmítico + álcool cetílico) e razão molar entre álcool cetílico e ácido palmítico de 2:1 foram levantadas para três condições de agitação: 180 rpm, 480 rpm e 720 rpm, conforme indicado nas análises CL1, CL2 e CL3. Essas condições foram escolhidas por representarem uma condição mais crítica para a transferência de massa, com maior viscosidade e maior quantidade de catalisador.

TABELA 4.5 - PLANEJAMENTO EXPERIMENTAL PARA REAÇÕES CATALISADAS PELA LIPOZYME RM IM®.

Análise	Agitação (rpm)	% Catalisador (m/m substratos)	RM (álcool:ácido)	T (°C)	Tempo
CL1	180	1,7	2:1	60	15 min, 30 min, 1h, 1h30min, 2h
CL2	480	1,7	2:1	60	15 min, 30 min, 1h, 1h30min, 2h
CL3	720	1,7	2:1	60	15 min, 30 min, 1h, 1h30min, 2h
CL4	480	0,5	1:1	70	15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h
CL5	480	1,0	1:1	70	15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h
CL6	480	1,5	1:1	70	15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h
CL7	480	1,0	0,5:1	70	15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h
CL8	480	1,0	2:1	70	15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h
CL9	480	1,0	1:1	60	15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h
CL10	480	1,0	1:1	80	15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h
CL11	480	1,0	1:1	87	15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h
CL12	480	0,75	0,75:1	65	15 min, 30 min, 1h, 2h, 3h
CL13	480	2,0	2,5:1	65	15 min, 30 min, 1h, 2h

Após escolha da agitação mais adequada para o sistema, os experimentos seguiram um planejamento com variação de três parâmetros, sendo eles quantidade de catalisador, variando entre 0,5% e 1,0% (análises CL4, CL5 e CL6), razão molar, variando de 0,5:1 a 2:1 (análises CL5, CL7 e CL8) e temperatura, variando entre 60 °C e 87 °C (análises CL5, CL9, CL10 e CL11).

Os valores adotados para as razões molares e concentração de catalisador foram baseados nas condições ótimas obtidas por (SERRANO-ARNALDOS et al., 2016) para a esterificação de álcool cetílico com ácido palmítico utilizando como enzima comercial a *Novozym 435*[®]. A temperatura mínima a ser adotada para a reação foi escolhida de acordo com a temperatura de fusão dos reagentes. A 60 °C é possível solubilizar ambos os reagentes nas proporções molares escolhidas (AL-MAMUN, 1974). A temperatura máxima de 87 °C foi adotada pois foi possível observar experimentalmente que a taxa de reação estava constante na faixa entre 80 °C e 87 °C, então um aumento além desse valor não favoreceria a cinética.

Os dados experimentais obtidos para as análises CL4 a CL11 foram utilizados para estimação dos parâmetros do modelo cinético proposto, totalizando 48 pontos experimentais. As curvas CL12 e CL13 foram utilizadas para validação e teste da capacidade de predição do modelo ajustado, por esse motivo as condições aplicadas são diferentes das utilizadas para estimação dos parâmetros. A diferença entre as curvas CL12 e CL3 é que a primeira foi conduzida em condições (0,75% de *Lipozyme RM IM*, 65 °C e razão molar de 0,75:1) dentro da faixa das condições experimentais da estimação de parâmetros, enquanto a segunda foi conduzida em condições (2,0% de *Lipozyme RM IM*, 65 °C e razão molar de 2,5:1) fora dessa faixa, com objetivo de verificar a capacidade de extrapolação do modelo.

A curva de referência CL5 foi realizada em triplicata para determinação dos desvios padrões experimentais, de acordo com Equação 4.1.

$$\sigma = \sqrt{\frac{\sum (x - \bar{x})^2}{n - 1}} \quad 4.1$$

Onde: σ é o desvio padrão amostral.

n é o número de pontos experimentais, nesse caso $n=3$.

x é a conversão experimental.

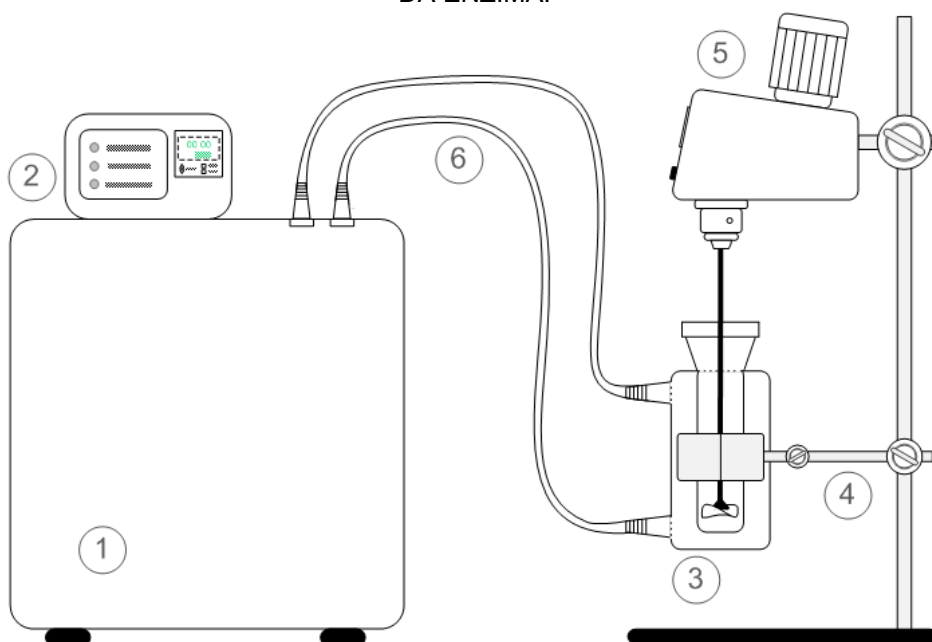
\bar{x} é a média das n conversões experimentais.

4.3.2 Estudo de reuso da enzima comercial imobilizada

Como as enzimas imobilizadas possuem custo elevado, é importante que o seu reuso seja estudado para que os custos do processo sejam reduzidos e a aplicação deste tipo de catalisador seja viável.

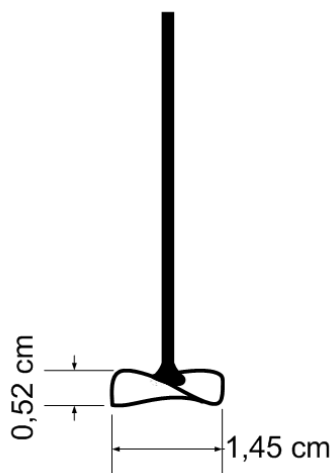
Para o estudo de reuso, a agitação magnética utilizada anteriormente foi substituída por agitação mecânica com hélice de duas pás, conforme representado na FIGURA 4.3 e na FIGURA 4.4. A substituição foi feita para evitar o cisalhamento e degradação física do catalisador que poderia ser provocado pelo contato entre a barra magnética e as paredes do reator. Como o objetivo é utilização do mesmo catalisador no maior número de ciclos possíveis, a quebra do catalisador poderia gerar perdas no processo de filtração e/ou desativação por desprendimento da enzima do suporte, além de mascarar os resultados referentes a desativação por exposição a altas temperaturas ou ocupação dos sítios ativos pelos produtos e reagentes.

FIGURA 4.3 - ESQUEMA REACIONAL COM AGITAÇÃO MECÂNICA PARA ESTUDO DE REUSO DA ENZIMA.



1-Banho termostático. 2-Controlador de temperatura. 3-Reator. 4-Garras de fixação. 5-Agitador mecânico. 6-Mangueiras. Sem escala. FONTE: A autora (2017).

FIGURA 4.4 - DETALHAMENTO DO IMPELIDOR USADO NA AGITAÇÃO MECÂNICA.



FONTE: A autora (2017).

Antes de conduzir os experimentos referentes ao ciclos, um teste preliminar foi feito para encontrar velocidade do agitador mecânico que fosse correspondente à utilizada nos experimentos com agitação magnética, dessa forma os experimentos podem ser considerados equivalentes e com mesmo grau de mistura. Para isso, uma condição da curva CL5 (1,0% de enzima, razão molar de 1:1, 70 °C e 30 minutos de reação), previamente conduzida com agitação magnética, foi repetida no sistema com agitação mecânica e a velocidade de rotação foi variada até que as conversões obtidas nos dois sistemas fossem iguais (dentro dos limites inferior e superior definidos pelo desvio padrão). A velocidade de 900 rpm foi encontrada como equivalente à agitação magnética de 480 rpm, e portanto foi adotada em todos os experimentos de estudo de reuso da enzima.

O estudo de reutilização do catalisador foi feito ao aplicar a mesma carga da enzima *Lipozyme RM IM* em diversos ciclos a 900 rpm, 70 °C, 1,0% de catalisador, razão molar de 1:1 e duas horas de reação (sem adição de solvente durante o período da reação). Após decorrido o tempo de reação, a enzima era então filtrada à vácuo com aproximadamente 30 ml de *n*-hexano e deixada durante 1 hora em temperatura ambiente para evaporação do solvente. O catalisador era então guardado sob refrigeração até próximo uso. O objetivo é analisar a queda na conversão a cada ciclo.

4.4 ACOMPANHAMENTO DAS REAÇÕES E ANÁLISES QUÍMICAS

A quantidade de ácido palmítico restante ao final da reação foi determinada por titulação com solução de NaOH 0,1 M padronizada com Biftalato de Potássio. Como indicador foi utilizada solução alcoólica de fenolftaleína (1% m/m). Antes do início da titulação, o recipiente contendo a amostra em etanol era aquecido a aproximadamente 65 °C para solubilização de todos os componentes.

Graeser (2013) e Leão (2009) estudaram a esterificação de ácidos graxos saturados em etanol anidro na ausência de catalisador, o que reproduz as condições do momento da titulação da amostra. Graeser (2013) obteve aproximadamente 3% de conversão para a esterificação de ácido láurico durante 5 minutos a 120 °C, enquanto Leão (2009) obteve apenas 0,85% de conversão para a esterificação de ácido palmítico a 150 °C em 5 minutos. Como a temperatura média atingida no momento da solubilização da amostra em etanol (em torno de 65 °C) é significativamente menor que as temperaturas utilizadas pelo autores citados, a cinética de esterificação não catalítica torna-se ainda mais desfavorável. Esses valores mostram que, para intervalos curtos de tempo e temperaturas baixas, a hipótese de esterificação do ácido palmítico, contido na amostra, com etanol pode ser desprezada.

4.4.1 Cálculo da conversão para catálise ácida homogênea

Para as reações que foram catalisadas pelo ácido sulfúrico, a conversão da reação pode ser determinada a partir do número de mols do ácido no início ($n_{t=0}^{Ap}$) e no final (n_t^{Ap}) da reação, conforme Equação 4.2.

$$\text{Conversão(\%)} = \frac{(n_{t=0}^{Ap} - n_t^{Ap})100}{n_{t=0}^{Ap}} \quad 4.2$$

O número de mols ao final da reação é obtido a partir da titulação, no entanto a quantidade de NaOH consumida para neutralização apenas do ácido palmítico presente na amostra é obtida a partir da quantidade total de NaOH consumido. Dessa forma, a parte referente à neutralização do próprio ácido sulfúrico deve ser descontada, conforme apresentado na Equação 4.3.

$$\text{Convers\~ao}(\%) = \frac{[n_{t=0}^{\text{Ap}} - (n_{\text{total}}^{\text{NaOH}} - n_{\text{H}_2\text{SO}_4}^{\text{NaOH}})]100}{n_{t=0}^{\text{Ap}}} \quad 4.3$$

Reescrevendo a Equa\~ao 4.3 em termos das massas de \~acido palm\~itico e das massa molares do componentes e considerando que s\~ao necess\'arios dois mols de NaOH para neutraliza\~ao do \~acido sulf\'urico, obt\~em-se a Equa\~ao 4.4.

$$\text{Convers\~ao}(\%) = \frac{\left[\frac{m_{t=0}^{\text{Ap}}}{\text{MM}_{\text{Ap}}} - \left(\frac{V_{\text{NaOH}}}{1000} M \frac{m_{\text{total}}}{m_{\text{amostra}}} - 2 \frac{\text{Pureza}_{\text{H}_2\text{SO}_4} m_{\text{cat}}}{\text{MM}_{\text{H}_2\text{SO}_4}} \right) \right] 100}{\frac{m_{t=0}^{\text{Ap}}}{\text{MM}_{\text{Ap}}}} \quad 4.4$$

4.4.2 C\'alculo da convers\~ao para cat\'alise heterog\~enea

Para as rea\~oes que foram catalisadas por sementes oleaginosas e pela enzima imobilizada *Lipozyme RM IM*, a convers\~ao foi determinada a partir da acidez da amostra no in\~icio e no final da rea\~ao, conforme Equa\~ao 4.5.

$$\text{Convers\~ao}(\%) = \frac{(\text{AGL}_{t=0} - \text{AGL}_t)100}{\text{AGL}_{t=0}} \quad 4.5$$

Onde: $\text{AGL}_{t=0}$ \'\e a acidez no in\~icio da rea\~ao, ou seja, em $t=0$.

AGL_t \'\e a acidez ap\'os o tempo de rea\~ao avaliado.

A acidez foi calculada de acordo com Equa\~ao 4.6.

$$\text{AGL}(\%) = \frac{V_{\text{NaOH}} \text{MM}_{\text{Ap}} M}{m_{\text{amostra}} 10} \quad 4.6$$

Onde: AGL \'\e a porcentagem m\'assica de \~acido na amostra.

V_{NaOH} \'\e o volume de solu\~ao de NaOH utilizado para neutraliza\~ao, em ml.

M \'\e a molaridade corrigida da solu\~ao de NaOH, em mol/l.

MM_{Ap} \'\e a massa molar do \~acido palm\~itico, em g/mol.

m_{amostra} \'\e a massa da amostra utilizada na titula\~ao, em gramas.

4.4.3 Cromatografia em fase gás

A identificação de ácido palmítico, álcool cetílico e palmitato de cetila nas amostras foram analisadas usando cromatografia em fase gasosa em cromatógrafo Shimadzu® 2010 Plus equipado com coletor de amostra automático, um injetor *split/splitless* com razão de 1:10 e detector de ionização de chama (FID).

As análises foram realizadas em uma coluna capilar *Agilent Select Biodiesel* (0,32 mm × 0,10 mm, 15 m). As temperaturas da injeção e do detector foram de 380 °C e 400 °C, respectivamente. O gás de transporte utilizado foi hélio a 29,2 cm³/min e o volume injetado foi de 1,0 µl.

A temperatura inicial programada da coluna foi de 50 °C seguido por uma taxa de aquecimento de 15 °C/min até atingir 180 °C, quando a taxa de aquecimento passou para 7 °C/min até 230 °C, e então 10 °C/min até 380 °C, onde permaneceu durante 6 minutos.

Duas amostra foram analisadas por cromatografia, sendo a primeira contendo a mistura de álcool cetílico e ácido palmítico, com objetivo de identificação dos picos dos reagentes.

A segunda amostra continha produto de uma reação de síntese de palmitato de cetila e foi analisada por cromatografia para validação qualitativa do resultado obtido por titulação. As condições utilizadas para essa reação foram de 1,0% de catalisador (m/m substratos), razão molar álcool:ácido de 1:1, 70 °C e 8 horas de reação, para que a conversão de equilíbrio fosse atingida. Nessas condições a conversão da reação tende a ser completa, e então espera-se que o cromatograma indique majoritariamente o pico referente ao produto palmitato de cetila.

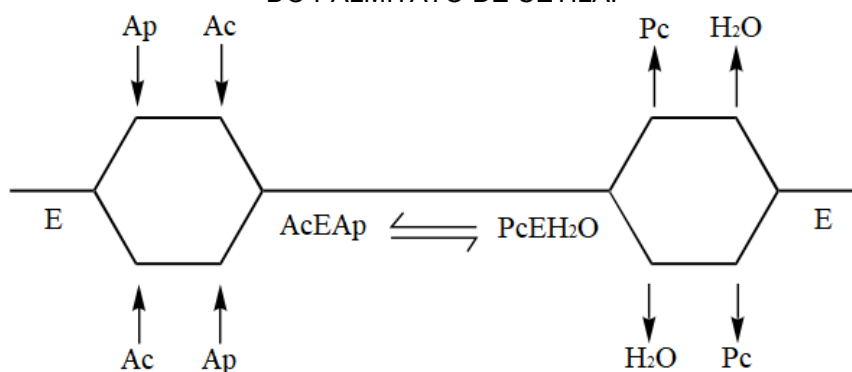
4.5 MODELAGEM CINÉTICA

A modelagem cinética enzimática de reações com dois ou mais substratos pode ser conduzidas de duas maneiras, sendo nomeadas como ping-pong ou sequenciais. Nos mecanismos do tipo ping-pong, um ou mais produtos são liberados antes de todos os substratos reagirem, enquanto que nos mecanismos sequenciais todos os substratos devem se combinar com a enzima antes da liberação dos produtos (MARANGONI, 2003). Adicionalmente, os mecanismo sequenciais podem ser classificados em ordenado ou randômico, onde no primeiro caso os substratos

reagem com a enzima em uma ordem específica, e consequentemente liberam os produtos também em uma ordem específica. No segundo caso, a ordem de ligação entre os substratos e a enzima não seguem uma ordem pré-determinada, ou seja, as ligações são independentes e não há interações mútuas (BISSWANGER, 2002).

O modelo Bi bi randômico sequencial foi escolhido para desenvolvimento da modelagem cinética da síntese de palmitato de cetila por ser o mecanismo com mecanismo simplificado e com menor número de parâmetros a serem ajustados. A FIGURA 4.5 apresenta um esquema do mecanismo de reação bi bi randômico sequencial, onde a ordem de ligação dos substratos à enzima não influencia na formação dos complexos e na ordem de liberação dos produtos.

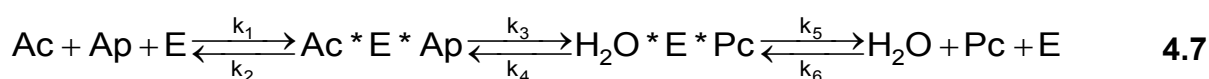
FIGURA 4.5 - ESQUEMA PARA MECANISMO BI BI RANDÔMICO SEQUENCIAL PARA SÍNTESE DO PALMITATO DE CETILA.



Símbolos: enzima (E), álcool cetílico (Ac), ácido palmítico (Ap), palmitato de cetila (Pc).

FONTE: adaptado de Marangoni (2003).

Para o desenvolvimento do modelo, as seguintes hipóteses foram consideradas: reações em batelada, isotérmicas, volume do meio reacional constante e reator de mistura perfeita. A reação geral que descreve o mecanismo de reação é dada pela Equação 4.7. As reações enzimáticas podem ter sua taxa de reação alterada por efeitos de inibição dos sítios ativos da enzima. Como esse efeito pode reduzir a atividade enzimática, o tipo de ligação formada pelo inibidor é importante para o tratamento dos dados experimentais (BISSWANGER, 2002). Considerando que a síntese do palmitato de cetila sofre inibição reversível de segunda ordem gerada pelos substratos e pelos produtos, as reações que descrevem tal efeito podem ser descritas conforme Equações 4.8 a 4.11.





As taxas de reação podem ser descritas através de equações diferenciais para os produtos e reagentes, conforme Equações 4.12 a 4.15.

$$\frac{d[\text{Ap}]}{dt} = -k_1[\text{Ac}][\text{Ap}][\text{E}] + k_2[\text{Ac} * \text{E} * \text{Ap}] - k_9[\text{Ap}]^2[\text{E}] + k_{10}[\text{Ap} * \text{E} * \text{Ap}] \quad 4.12$$

$$\frac{d[\text{Ac}]}{dt} = -k_1[\text{Ac}][\text{Ap}][\text{E}] + k_2[\text{Ac} * \text{E} * \text{Ap}] - k_7[\text{Ac}]^2[\text{E}] + k_8[\text{Ac} * \text{E} * \text{Ac}] \quad 4.13$$

$$\frac{d[\text{H}_2\text{O}]}{dt} = k_5[\text{H}_2\text{O} * \text{E} * \text{Pc}] - k_6[\text{E}][\text{H}_2\text{O}][\text{Pc}] - k_{11}[\text{H}_2\text{O}]^2[\text{E}] + k_{12}[\text{H}_2\text{O} * \text{E} * \text{H}_2\text{O}] \quad 4.14$$

$$\frac{d[\text{Pc}]}{dt} = k_5[\text{H}_2\text{O} * \text{E} * \text{Pc}] - k_6[\text{E}][\text{H}_2\text{O}][\text{Pc}] - k_{13}[\text{Pc}]^2[\text{E}] + k_{14}[\text{Pc} * \text{E} * \text{Pc}] \quad 4.15$$

A hipótese de estado pseudo estacionário diz que, como os intermediários de reação possuem tempo de vida curto e alta reatividade, sua concentração no meio reacional será sempre baixa e a taxa de formação pode ser considerada igual à taxa de desaparecimento, o que resulta em taxa global de formação igual a zero (FOGLER, 1999). Assim, para os intermediários, obtém-se as Equações 4.16 a 4.21.

$$\frac{d[\text{Ac} * \text{E} * \text{Ap}]}{dt} = k_1[\text{Ac}][\text{Ap}][\text{E}] - (k_2 + k_3)[\text{Ac} * \text{E} * \text{Ap}] + k_4[\text{H}_2\text{O} * \text{E} * \text{Pc}] = 0 \quad 4.16$$

$$\frac{d[\text{H}_2\text{O} * \text{E} * \text{Pc}]}{dt} = k_3[\text{Ac} * \text{E} * \text{Ap}] - (k_4 + k_5)[\text{H}_2\text{O} * \text{E} * \text{Pc}] + k_6[\text{E}][\text{H}_2\text{O}][\text{Pc}] = 0 \quad 4.17$$

$$\frac{d[\text{Ac} * \text{E} * \text{Ac}]}{dt} = k_7[\text{Ac}]^2[\text{E}] - k_8[\text{Ac} * \text{E} * \text{Ac}] = 0 \quad 4.18$$

$$\frac{d[\text{Ap} * \text{E} * \text{Ap}]}{dt} = k_9[\text{Ap}]^2[\text{E}] - k_{10}[\text{Ap} * \text{E} * \text{Ap}] = 0 \quad 4.19$$

$$\frac{d[\text{H}_2\text{O} * \text{E} * \text{H}_2\text{O}]}{dt} = k_{11}[\text{H}_2\text{O}]^2[\text{E}] - k_{12}[\text{H}_2\text{O} * \text{E} * \text{H}_2\text{O}] = 0 \quad 4.20$$

$$\frac{d[Pc * E * Pc]}{dt} = k_{13}[Pc]^2[E] - k_{14}[Pc * E * Pc] = 0 \quad 4.21$$

A concentração de enzima livre disponível pode ser escrita como a diferença entre a quantidade total de enzima e os complexos formados.

$$[E] = \left([E_t] - [Ac * E * Ap] - [H_2O * E * Pc] - [Ac * E * Ac] - [Ap * E * Ap] - [H_2O * E * H_2O] - [Pc * E * Pc] \right) \quad 4.22$$

Aplicando manipulações algébricas com auxílio do *software Maple*[®], é possível isolar a concentração dos intermediários $[Ac * E * Ap]$, $[H_2O * E * Pc]$, $[Ac * E * Ac]$, $[Ap * E * Ap]$, $[H_2O * E * H_2O]$, $[Pc * E * Pc]$ e concentração de enzima livre $[E]$ em função da concentração dos produtos e dos reagentes, das constantes do mecanismo proposto e da concentração total de enzima.

$$[E] = \frac{[E_t]k_{10}k_{12}k_{14}k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5)}{k_{10}k_{12}k_{14}k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) + [Ac][Ap]k_1k_{10}k_{12}k_{14}k_8(k_3 + k_4 + k_5) + [H_2O][Pc]k_{10}k_{12}k_{14}k_8k_6(k_2 + k_3 + k_4) + [Ac]^2k_{10}k_{12}k_{14}k_7(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) + [Ap]^2k_{12}k_{14}k_9k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) + [H_2O]^2k_{14}k_{11}k_{10}k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) + [Pc]^2k_{13}k_{12}k_{10}k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5)} \quad 4.23$$

$$[Ac * E * Ap] = \frac{[E_t]k_{10}k_{12}k_{14}k_8([Ac][Ap]k_1k_4 + [Ac][Ap]k_1k_5 + [H_2O][Pc]k_4k_6)}{k_{10}k_{12}k_{14}k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) + [Ac][Ap]k_1k_{10}k_{12}k_{14}k_8(k_3 + k_4 + k_5) + [H_2O][Pc]k_{10}k_{12}k_{14}k_8k_6(k_2 + k_3 + k_4) + [Ac]^2k_{10}k_{12}k_{14}k_7(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) + [Ap]^2k_{12}k_{14}k_9k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) + [H_2O]^2k_{14}k_{11}k_{10}k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) + [Pc]^2k_{13}k_{12}k_{10}k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5)} \quad 4.24$$

$$[H_2O * E * Pc] = \frac{[E_t]k_8k_{10}k_{12}k_{14}([Ac][Ap]k_1k_3 + [H_2O][Pc]k_2k_6 + [H_2O][Pc]k_3k_6)}{k_{10}k_{12}k_{14}k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) + [Ac][Ap]k_1k_{10}k_{12}k_{14}k_8(k_3 + k_4 + k_5) + [H_2O][Pc]k_{10}k_{12}k_{14}k_8k_6(k_2 + k_3 + k_4) + [Ac]^2k_{10}k_{12}k_{14}k_7(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) + [Ap]^2k_{12}k_{14}k_9k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) + [H_2O]^2k_{14}k_{11}k_{10}k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) + [Pc]^2k_{13}k_{12}k_{10}k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5)} \quad 4.25$$

$$[Ac * E * Ac] = \frac{[E_t]k_7k_{10}k_{12}k_{14}[Ac]^2(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5)}{k_{10}k_{12}k_{14}k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) + [Ac][Ap]k_1k_{10}k_{12}k_{14}k_8(k_3 + k_4 + k_5) + [H_2O][Pc]k_{10}k_{12}k_{14}k_8k_6(k_2 + k_3 + k_4) + [Ac]^2k_{10}k_{12}k_{14}k_7(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) + [Ap]^2k_{12}k_{14}k_9k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) + [H_2O]^2k_{14}k_{11}k_{10}k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) + [Pc]^2k_{13}k_{12}k_{10}k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5)} \quad 4.26$$

$$[Ap^* E^* Ap] = \frac{[E_t]k_9k_8k_{12}k_{14}[Ap]^2(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5)}{\left(\begin{aligned} &k_{10}k_{12}k_{14}k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) \\ &+ [Ac][Ap]k_1k_{10}k_{12}k_{14}k_8(k_3 + k_4 + k_5) + [H_2O][Pc]k_{10}k_{12}k_{14}k_8k_6(k_2 + k_3 + k_4) \\ &+ [Ac]^2k_{10}k_{12}k_{14}k_7(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) + [Ap]^2k_{12}k_{14}k_9k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) \\ &+ [H_2O]^2k_{14}k_{11}k_{10}k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) + [Pc]^2k_{13}k_{12}k_{10}k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) \end{aligned} \right)} \quad 4.27$$

$$[H_2O^* E^* H_2O] = \frac{[E_t]k_{11}k_8k_{10}k_{14}[H_2O]^2(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5)}{\left(\begin{aligned} &k_{10}k_{12}k_{14}k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) \\ &+ [Ac][Ap]k_1k_{10}k_{12}k_{14}k_8(k_3 + k_4 + k_5) + [H_2O][Pc]k_{10}k_{12}k_{14}k_8k_6(k_2 + k_3 + k_4) \\ &+ [Ac]^2k_{10}k_{12}k_{14}k_7(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) + [Ap]^2k_{12}k_{14}k_9k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) \\ &+ [H_2O]^2k_{14}k_{11}k_{10}k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) + [Pc]^2k_{13}k_{12}k_{10}k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) \end{aligned} \right)} \quad 4.28$$

$$[Pc^* E^* Pc] = \frac{[E_t]k_{13}k_8k_{10}k_{12}[Pc]^2(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5)}{\left(\begin{aligned} &k_{10}k_{12}k_{14}k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) \\ &+ [Ac][Ap]k_1k_{10}k_{12}k_{14}k_8(k_3 + k_4 + k_5) + [H_2O][Pc]k_{10}k_{12}k_{14}k_8k_6(k_2 + k_3 + k_4) \\ &+ [Ac]^2k_{10}k_{12}k_{14}k_7(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) + [Ap]^2k_{12}k_{14}k_9k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) \\ &+ [H_2O]^2k_{14}k_{11}k_{10}k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) + [Pc]^2k_{13}k_{12}k_{10}k_8(k_2k_4 + k_2k_5 + k_3k_5) \end{aligned} \right)} \quad 4.29$$

Substituindo as Equações 4.23 a 4.29 nas Equações 4.12 a 4.15, realizando as manipulações algébricas e as simplificações possíveis (com auxílio do *software Maple*[®]), são obtidas as equações diferenciais que representam as taxas de reação.

$$\frac{d[Ap]}{dt} = \frac{-[E_t](V_1[Ac][Ap] - V_2[H_2O][Pc])}{1 + K_1[Ac][Ap] + K_2[H_2O][Pc] + K_3[Ac]^2 + K_4[Ap]^2 + K_5[H_2O]^2 + K_6[Pc]^2} \quad 4.30$$

$$\frac{d[Ac]}{dt} = \frac{-[E_t](V_1[Ac][Ap] - V_2[H_2O][Pc])}{1 + K_1[Ac][Ap] + K_2[H_2O][Pc] + K_3[Ac]^2 + K_4[Ap]^2 + K_5[H_2O]^2 + K_6[Pc]^2} \quad 4.31$$

$$\frac{d[H_2O]}{dt} = \frac{[E_t](V_1[Ac][Ap] - V_2[H_2O][Pc])}{1 + K_1[Ac][Ap] + K_2[H_2O][Pc] + K_3[Ac]^2 + K_4[Ap]^2 + K_5[H_2O]^2 + K_6[Pc]^2} \quad 4.32$$

$$\frac{d[Pc]}{dt} = \frac{[E_t](V_1[Ac][Ap] - V_2[H_2O][Pc])}{1 + K_1[Ac][Ap] + K_2[H_2O][Pc] + K_3[Ac]^2 + K_4[Ap]^2 + K_5[H_2O]^2 + K_6[Pc]^2} \quad 4.33$$

Como nas Equações 4.30 a 4.33 a concentração total de enzima $[E_t]$ está em expressa em unidades de $(\text{mmol}_{\text{enzima}}/\text{g}_{\text{substrato}})$ e a massa molar da enzima não é conhecida, é necessário substituir a concentração molar total de enzima $[E_t]$ pela concentração total mássica de enzimas $[E_t^m]$ que é dada pela Equação 4.34.

$$[E_t^m] = [E_t]MM_{enzima} \quad 4.34$$

Para manter a consistência de unidades, as constantes V_1 e V_2 devem ser divididas pela “massa molar da enzima” (MM_{enzima}). Assim, as constantes V_1 , V_2 , K_i ($i=1,2...6$) são funções das constantes k_j ($j=1,2...6$) do mecanismo, conforme Equações 4.35 a 4.42.

$$V_1 = \frac{k_1 k_3 k_5}{(k_2 k_4 + k_2 k_5 + k_3 k_5)MM_{enzima}} \quad 4.35$$

$$V_2 = \frac{k_2 k_4 k_6}{(k_2 k_4 + k_2 k_5 + k_3 k_5)MM_{enzima}} \quad 4.36$$

$$K_1 = \frac{k_1(k_3 + k_4 + k_5)}{k_2 k_4 + k_2 k_5 + k_3 k_5} \quad 4.37$$

$$K_2 = \frac{k_6(k_2 + k_3 + k_4)}{k_2 k_4 + k_2 k_5 + k_3 k_5} \quad 4.38$$

$$K_3 = \frac{k_7}{k_8} \quad 4.39$$

$$K_4 = \frac{k_9}{k_{10}} \quad 4.40$$

$$K_5 = \frac{k_{11}}{k_{12}} \quad 4.41$$

$$K_6 = \frac{k_{13}}{k_{14}} \quad 4.42$$

As constantes k_1 , k_6 , k_7 , k_9 , k_{11} e k_{13} são expressas em unidades de ($g_{substrato}^2/mmola_{enzima}mmola_{substrato}h$), enquanto que as constantes k_2 , k_3 , k_4 , k_5 , k_8 , k_{10} , k_{12} e k_{14} são expressas em (h^{-1}). Assim, as unidades das constantes aparentes V_1 e V_2 são ($g_{substrato}^2/mmola_{substrato}mg_{enzima}h$) e as unidades de K_i ($i=1,2...6$) são ($g_{substrato}^2/mmola_{enzima}mmola_{substrato}$).

Analisando as Equações 4.30 a 4.33, nota-se que as velocidades de reação estão descritas como diretamente proporcionais à concentração total de enzima no meio. No entanto, para sistemas reais, excesso de enzima no meio pode formar aglomerados e dificultar o acesso dos substratos aos sítios ativos (BANSODE; RATHOD, 2014; DENG et al., 2011; SERRANO-ARNALDOS et al., 2016). Assim, o valor da concentração total de enzimas $[E_t]$ precisa ser substituído pela quantidade

total de enzimas disponíveis aos substratos $[E_t^d]$. Seguindo a metodologia proposta por Voll *et al.* (2012), a função proposta para a correção pode ser dada pela Equação 4.43.

$$[E_t^d] = [E_t^m] \exp(-k_c [E_t^m]) \quad 4.43$$

A Equação 4.43 representa o valor da concentração de enzimas efetivamente disponíveis para realizar a reação em função da concentração total de enzima no sistema, sendo que a função pode assumir valor igual a 1 (constante) caso não haja redução da transferência de massa devido ao excesso de enzima e valores menores que 1 conforme a concentração de enzima aumenta.

Substituindo a Equação 4.43 nas equações diferenciais que representam o modelo (Equações 4.30 a 4.33) foi obtido o conjunto de equações que descreve a síntese do palmitato de cetila.

$$\frac{d[Ap]}{dt} = \frac{-[E_t^m] e^{(-k_c [E_t^m])} (V_1 [Ac][Ap] - V_2 [H_2O][Pc])}{1 + K_1 [Ac][Ap] + K_2 [H_2O][Pc] + K_3 [Ac]^2 + K_4 [Ap]^2 + K_5 [H_2O]^2 + K_6 [Pc]^2} \quad 4.44$$

$$\frac{d[Ac]}{dt} = \frac{-[E_t^m] e^{(-k_c [E_t^m])} (V_1 [Ac][Ap] - V_2 [H_2O][Pc])}{1 + K_1 [Ac][Ap] + K_2 [H_2O][Pc] + K_3 [Ac]^2 + K_4 [Ap]^2 + K_5 [H_2O]^2 + K_6 [Pc]^2} \quad 4.45$$

$$\frac{d[H_2O]}{dt} = \frac{[E_t^m] e^{(-k_c [E_t^m])} (V_1 [Ac][Ap] - V_2 [H_2O][Pc])}{1 + K_1 [Ac][Ap] + K_2 [H_2O][Pc] + K_3 [Ac]^2 + K_4 [Ap]^2 + K_5 [H_2O]^2 + K_6 [Pc]^2} \quad 4.46$$

$$\frac{d[Pc]}{dt} = \frac{[E_t^m] e^{(-k_c [E_t^m])} (V_1 [Ac][Ap] - V_2 [H_2O][Pc])}{1 + K_1 [Ac][Ap] + K_2 [H_2O][Pc] + K_3 [Ac]^2 + K_4 [Ap]^2 + K_5 [H_2O]^2 + K_6 [Pc]^2} \quad 4.47$$

4.5.1 Influência da temperatura

As constantes V_1 e V_2 representam a velocidade das reações direta e inversa, respectivamente. Esses parâmetros podem ser ajustados individualmente para uma temperatura constante, ou então, quando há dados disponíveis de experimentos realizados a diferentes temperaturas, esses parâmetros podem ser escrito em função da temperatura de reação. Tradicionalmente, utiliza-se a relação de Arrhenius (Equação 4.48) para determinação das velocidades de reação, que é escrita em função do fator de frequência (A), da energia de ativação (E_a), da constante universal dos gases (R) e da temperatura absoluta de reação (T).

$$V = A \exp\left(\frac{-E_a}{RT}\right) \quad 4.48$$

A equação de Arrhenius pode ser escrita na forma linearizada (Equação 4.49), onde o gráfico de abcissa $1/T$ e ordenada $\ln(V)$ gera uma reta. Ao ajustar os parâmetros da equação, é possível obter a energia de ativação a partir do coeficiente angular (α) e o fator de frequência a partir do coeficiente linear (β), conforme Equações 4.50 e 4.51.

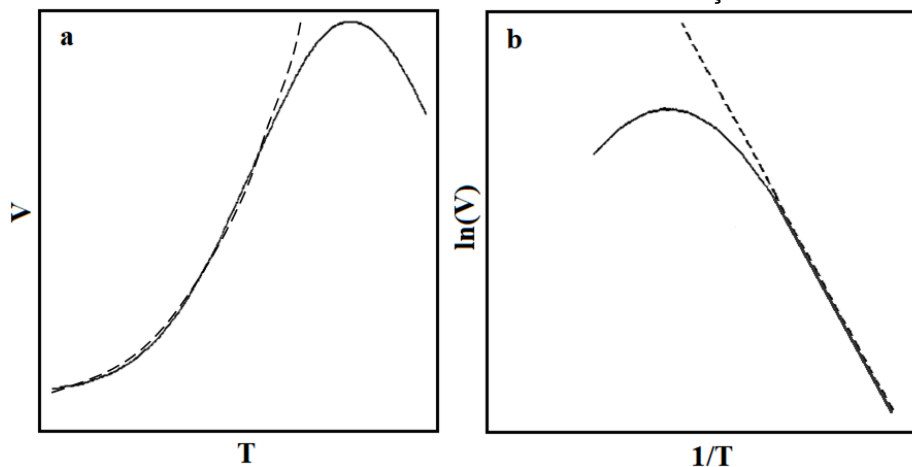
$$\ln(V) = \ln(A) - \frac{E_a}{RT} \quad 4.49$$

$$A = \exp(\beta) \quad 4.50$$

$$E_a = -\frac{R}{\alpha} \quad 4.51$$

No caso da cinética das reações enzimáticas, a velocidade de reação aumenta em média de duas ou três vezes a cada 10 °C de temperatura. Para altas temperaturas, no entanto, esse aumento se torna lento, atingindo um máximo e decaindo novamente (curva contínua da FIGURA 4.6(a)) devido a desativação térmica irreversível da enzima (BISSWANGER, 2002). No entanto, a equação de Arrhenius não consegue representar o sistema de cinéticas enzimáticas na faixa de temperatura em que há diminuição da atividade enzimática. Além disso, não é capaz de prever qual a temperatura máxima recomendada para operação, ou seja, não fornece dados sobre a temperatura de degradação térmica da enzima.

FIGURA 4.6 - COMPORTAMENTO DA VELOCIDADE DE REAÇÕES ENZIMÁTICAS.



Legenda: (A) curva da velocidade máxima aparente em função da temperatura. (b) plotagem de $\ln(v)$ versus $1/T$. Comportamento real (—) e predito pela equação de Arrhenius(— — —).

FONTE: adaptado de Bisswanger (2002).

A curva contínua da FIGURA 4.6(b) representa a reta obtida a partir da equação de Arrhenius., e nela é possível notar que embora a equação de Arrhenius descreva de maneira satisfatória o comportamento para baixas temperaturas, a velocidade máxima aparente passa a ser superestimada para temperaturas elevadas.

Com o objetivo de prever o comportamento na faixa onde há diminuição da velocidade de reação e encontrar a temperatura máxima de operação da enzima, uma equação foi proposta para o cálculo de V_1 e V_2 em função de novos parâmetros. A equação proposta deve ser semelhante à equação de Arrhenius ao considerar que a velocidade deve aumentar de acordo com a temperatura, porém deve tender a um valor finito ao atingir a temperatura máxima. Assim, a nova equação deve obedecer as seguintes restrições:

$$\frac{dfc}{dT} \geq 0 \quad (\text{Similiar à equação de Arrhenius}) \quad \mathbf{4.52}$$

$$\lim_{T \rightarrow \infty} fc = \text{constante} \quad (\text{Distinto da equação de Arrhenius}) \quad \mathbf{4.53}$$

A Equação 4.52 implica que a função deve retornar valor crescente conforme a temperatura aumenta e deve tender a zero para temperaturas menores. A Equação 4.53 implica que a função deve tender a um valor constante conforme a temperatura se aproxima da temperatura máxima de operação. A equação proposta que satisfaz essas restrições é dado pela Equação 4.54.

$$V = P[1 - e^{-Q(T-T_{ref})}] \quad \mathbf{4.54}$$

Ao atender essas restrições, a função é capaz de representar o comportamento da cinética enzimática até o ponto onde a velocidade é máxima, ou seja, até a temperatura onde não há degradação térmica. A região onde há decréscimo da velocidade não pode ser predita pela Equação 4.54, pois não há comportamento de mudança do sinal da derivada, ou seja, a função não representa inflexões. Reescrevendo a Equação 4.54 para os parâmetros de velocidade das reações diretas e inversas (V_1 e V_2) respectivamente:

$$V_1 = P_1[1 - e^{-Q_1(T-T_{ref})}] \quad 4.55$$

$$V_2 = P_2[1 - e^{-Q_2(T-T_{ref})}] \quad 4.56$$

Os parâmetros P_i ($g_{\text{substrato}}^2/(mg_{\text{enzima}}mmol_{\text{substrato}}h)$), Q_i (K^{-1}) e T_{ref} (K) devem ser ajustados para que o modelo represente o sistema estudado. A temperatura de referencia (T_{ref}) representa um temperatura mínima teórica abaixo da qual não ocorre reação.

4.5.2 Métodos numéricos

Os parâmetros do modelo cinético foram estimados ao aproximar o modelo dos dados experimentais ao utilizar a função objetivo dada pela Equação 4.57.

$$fob = \sum_{i=1}^{NE} (\text{Conversão}_i^{\text{exp}} - \text{Conversão}_i^{\text{calc}})^2 \quad 4.57$$

Para o cálculo da função objetivo foram utilizados 8 conjuntos de dados experimentais (análises CL4 a CL11 da TABELA 4.5) referentes as curvas cinéticas das reações de esterificação, cada conjunto com 6 pontos experimentais em diferentes tempos, totalizando 48 pontos experimentais ($NE=48$).

Para ajuste dos parâmetros, um algoritmo foi desenvolvido no software Matlab[®]. A sub-rotina *fminsearch* foi usada para minimizar a função objetivo (Equação 4.57) a partir do método simplex. Como não utiliza a derivada da função objetivo, é um método robusto para solução de problemas que dependam de modelos que são resolvidos numericamente. A sub-rotina *ode23s* foi usada para solução de sistema de equações diferenciais, que, por ser um método implícito, evita surgimento de problemas rígidos ao longo da estimação de parâmetros.

O erro de quadrado médio (RMSD – *Root Mean Square Deviation*) é uma medida frequentemente usada para representar o desvio padrão das amostras das diferenças entre valores experimentais e calculados pelo modelo. Representa a raiz quadrada da média de erros quadráticos, e pode ser do tipo residual (RMSD_r), quando calculado em função dos dados usados para a estimação de parâmetros (Equação 4.58) ou de predição (RMSD_p) quando calculado para dados fora desse grupo amostral (Equação 4.59).

$$\text{RMSD}_r = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^{NE} (\text{Convers\~ao}_i^{\text{exp}} - \text{Convers\~ao}_i^{\text{calc}})^2}{NE}} = \sqrt{\frac{\text{fob}}{NE}} \quad 4.58$$

$$\text{RMSD}_p = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N (\text{Convers\~ao}_i^{\text{exp,valida\~ao}} - \text{Convers\~ao}_i^{\text{calc}})^2}{N}} \quad 4.59$$

O valor de RMSD_r foi calculado utilizando o valor da função objetivo obtido a partir da Equação 4.57. O RMSD_p foi calculado em função dos experimentos realizados para validação do modelo, em condições distintas das aplicadas para a estimação dos parâmetros, num total de 6 pontos experimentais ($N=6$).

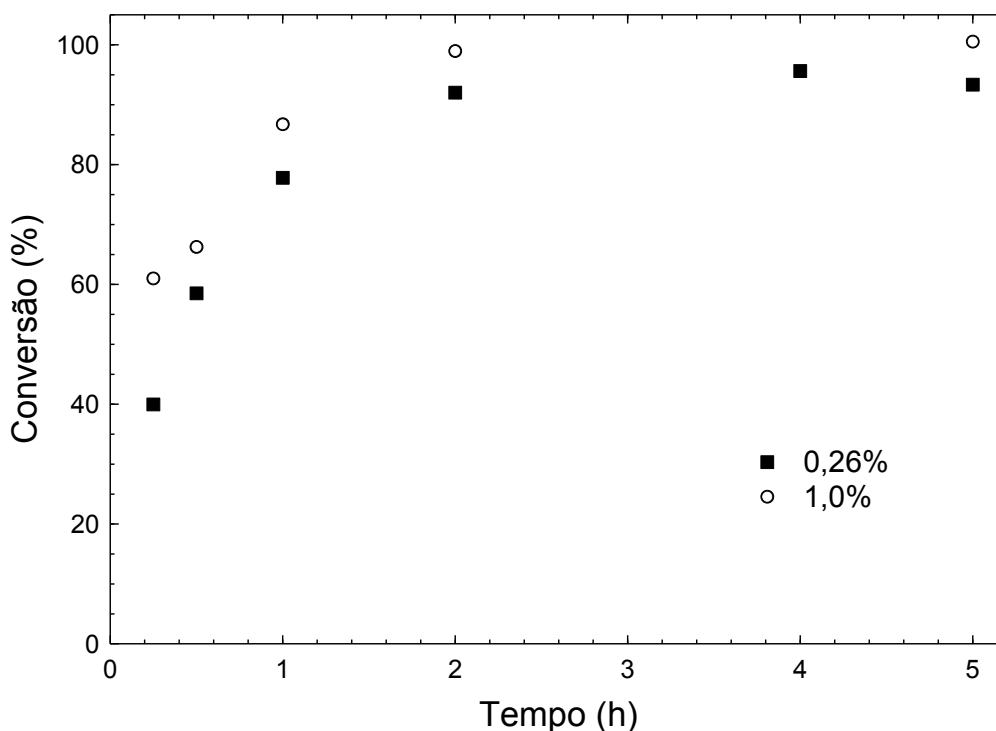
A variância paramétrica foi calculada seguindo a metodologia descrita por Bainy *et al.* (2017) e as incertezas do modelo a 95% de confiança foram determinadas de acordo com o modelo descrito por Friesen *et al.* (2015).

5 APRESENTAÇÃO DOS RESULTADOS

5.1 CATÁLISE ÁCIDA

Os resultados referentes a catálise ácida da síntese de palmitato de cetila estão disponíveis na FIGURA 5.1, que ilustra os dados experimentais para concentrações de catalisador de 0,26% e 1,0% (m/m dos substratos).

FIGURA 5.1 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DO CATALISADOR ÁCIDO SULFÚRICO.



Dados experimentais: (■) 0,26% e (○) 1,0% (massa ácido sulfúrico/massa substratos).
Condições de reação: RM 1:1, 80 °C, 720 rpm.

A presença do ácido sulfúrico no meio é capaz de promover a síntese do palmitato de cetila, sendo que o aumento da concentração de catalisador aumenta a taxa de reação. Para concentração de 1,0% de ácido sulfúrico, a conversão atingiu 100% após 5 horas de reação a 80 °C e razão molar de 1:1.

A síntese da cera oleato de oleíla também foi conduzida em condições próximas das adotadas nesse trabalho, e a conversão atingiu 93,9% em 5 horas de reação a 90 °C, 2,1% de ácido sulfúrico e razão molar de 1:1 (AL-ARAFI; SALIMON, 2012). Esses resultados mostram que a catálise ácida é eficiente para a síntese de ésteres de cadeia longa, assim como para catálise de ésteres de cadeia curta amplamente utilizada para a produção de biodiesel.

Como a principal aplicação da cera palmitato de cetila é a produção de cosméticos e produto de higiene pessoal, a utilização de catalisadores nocivos a saúde humana não é indicada. Ceras destinadas a indústrias que produzem produtos de higiene pessoal devem ter alto teor de pureza, além de ser livre de contaminações. A purificação e eliminação de catalisadores homogêneos pode gerar custos extras de processo e elevar o valor do produto. Dessa forma, a utilização da catálise ácida foi feita nesse trabalho apenas para fins de validação do sistema reacional e não será utilizada em futuros experimentos.

5.2 CATÁLISE POR SEMENTES OLEAGINOSAS

A sementes oleaginosas não germinadas tiveram sua atividade catalítica testada em reação de esterificação entre álcool *n*-propílico e ácido láurico e os resultados estão apresentados na TABELA 5.1.

TABELA 5.1 - RESULTADOS DA SÍNTESE DE LAURATO DE *N*-PROPILA CATALISADA POR SEMENTES OLEAGINOSAS.

Análise	Semente	% Sólidos (m/m substratos)	RM (ál:ác)	Temperatura (°C)	Tempo (h)	Conversão
CS1	Mamona	30	3:1	60	1	7,6%
CS2	Mamona	30	3:1	35	1	10,1%
CS3	Abóbora	30	3:1	60	1	3,4%
CS4	Quinoa	30	3:1	60	1	1,4%
CS5	Soja	30	3:1	60	1	-
CS6	Girassol	30	3:1	60	1	-
CS7	Grão de Bico	30	3:1	60	1	-

Nenhuma conversão significativa foi observada quando as sementes de soja, girassol e grão de bico foram empregadas. As conversões das reações utilizando sementes de abóbora e quinoa foram baixas e não indicam atividade catalítica satisfatória. Apenas a semente de mamona indicou alguma atividade catalítica nas condições de reação empregadas. Isso pode ser atribuído ao fato de a mamona ser uma das poucas sementes que apresentam atividade catalítica em seu estado não germinado (SRIVASTAVA et al., 2016; VILLENEUVE, 2003).

Como o objetivo é evitar geração de etapas adicionais referentes a processos de germinação, e por essa ser uma semente não comestível, apenas a semente de mamona foi aplicada em futuros procedimentos experimentais.

As três diferentes preparações realizadas com sementes de mamona foram aplicadas na síntese de palmitato de cetila. A conversão da análise preliminar CS1 à 60 °C foi ligeiramente menor se comparada à conversão da análise CS2 à 35 °C (TABELA 5.1), indicando possível desativação térmica. Por esse motivo algumas análises foram realizadas a 30-35 °C (TABELA 5.2), porém nesses casos foi necessário adicionar solvente ao sistema para solubilização dos componentes. Os resultados estão apresentados na TABELA 5.2.

TABELA 5.2 - RESULTADO DA SÍNTESE PALMITATO DE CETILA CATALISADA POR SEMENTE DE MAMONA.

Análise	Preparação Mamona	% Sólidos ^a	RM ^b	T (°C)	Tempo (h)	% <i>n</i> -hexano ^c	Conversão
CM1	Moagem	50	2:1	60	2	-	3,1%
CM2	Moagem	30	1:1	60	30	-	10,0%
CM3	Moagem	30	1:1	35	6	220	3,8%
CM4	Moagem + Estufa 60 °C	50	2:1	60	1	-	8,1%
CM5	Moagem + Estufa 60 °C	50	2:1	60	3	-	3,1%
CM6	Moagem + Extração óleo	20	1:1	35	2	100	-
CM7	Moagem + Extração óleo	20	1:1	35	7	100	-
CM8	Moagem + Extração óleo	10	1:1	35	2	100	-
CM9	Moagem + Extração óleo	10	1:1	35	7	100	-
CM10	Moagem + Extração óleo	10	1:1	30	6	200	3,9%

^a Quantidade de sólidos para teste de atividade catalítica (massa sólidos/massa substratos);

^b Razão molar entre os reagentes (álcool:ácido);

^c Quantidade de solvente (massa *n*-hexano/massa substratos).

A conversão máxima atingida foi em torno de 10% ao se utilizar semente de mamona moída no sistema (análise CM2), no entanto foram necessárias 30 horas de reação para atingir essa condição, indicando que o catalisador apresentou pouca influência na cinética de reação. Os resultados das análises utilizando semente de mamona que foram moídas e deixadas em estufa para evaporação de água não indicaram melhoria significativa na cinética, atingindo 8,1% de conversão. Os experimentos que foram realizados a temperaturas iguais ou inferiores a 35 °C, e portanto na presença de solvente, também não forneceram conversão de ácidos significativa.

A esterificação entre ácido oleico e fito esteróis foi estudada sob catálise por lipases proveniente de plantas e lipases microbianas (*Candida antarctica* e *Rhizomucor miehei*). O grau de esterificação das reações catalisadas por lipases de origem vegetal foram menores, sendo que a lipase de semente de mamona

forneceu apenas 3% de grau de esterificação após 24 horas (VILLENEUVE et al., 2005).

O fato de a semente não ter apresentando atividade catalítica satisfatória pode ser atribuído ao pH do sistema reacional. Sabe-se que as sementes não germinadas de mamona são capazes de catalisar reação de hidrólise de óleo de rícino em pH de 4,8 a 45 °C em 2 horas de reação (SRIVASTAVA et al., 2016). Villeneuve (2003) também reporta que a atividade catalítica da semente de mamona está presente em seu corpo lipídico e que é ativa em condições ácidas, com pH ótimo em torno de 4,1.

Esses resultados apontam que as sementes de mamona podem apresentar boa atividade catalítica mesmo em seu estado não germinado, no entanto são necessário estudos não só para obtenção de condições otimizadas para cada sistema, mas controle de pH e pré-tratamento das sementes para reduzir o tempo de reação e aumentar a viabilidade do processo. Como o objetivo deste trabalho é a obtenção de condições adequadas pra produção de palmitato de cetila e não especificamente a preparação de catalisadores, os estudos futuros serão realizados utilizando enzimas microbianas imobilizadas, devido a sua alta atividade e estabilidade.

5.3 AUSÊNCIA DE CATALISADOR – BRANCO DE REAÇÃO

As reações conduzidas na ausência de catalisador não apresentaram conversão significativa em nenhuma das condições estudadas, conforme TABELA 5.3.

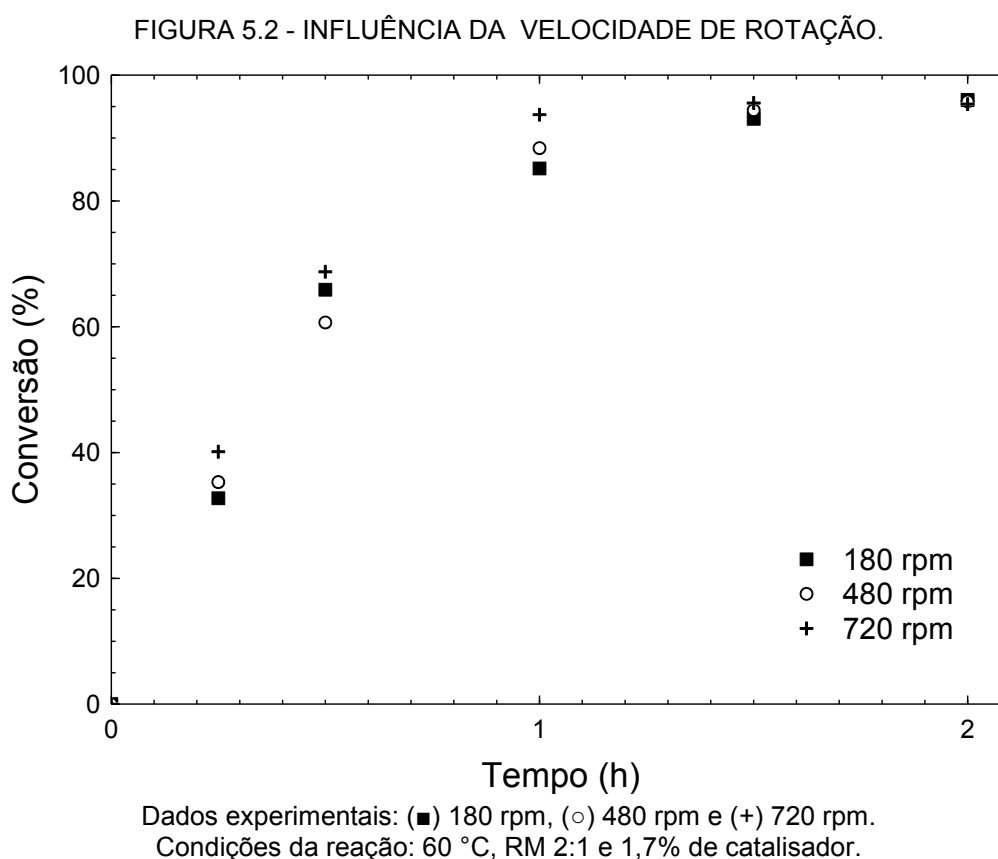
TABELA 5.3 - RESULTADOS PARA REAÇÕES NA AUSÊNCIA DE CATALISADOR.

Análise	Agitação (rpm)	% Catalisador (m/m substratos)	RM (álcool:ácido)	T (°C)	Tempo	Conversão (%)
BR1	480	-	2:1	60	1h	0%
					2h	0%
BR2	480	-	1:1	80	1h	0%
					2h	0%

O resultado obtido está de acordo com a informação obtida na literatura de que a reação espontânea entre álcool cetílico e ácido palmítico gera conversão menor que 1% ao dia à 65 °C (WEHTJE et al., 1999).

5.4 CATÁLISE POR ENZIMA COMERCIAL IMOBILIZADA

Como a catálise enzimática é fortemente influenciada pela transferência de massa, a velocidade de agitação pode influenciar na cinética de reação. Contudo, altas rotações podem causar danos físicos nos catalisadores enzimáticos, além de aumentar o consumo de energia do processo (BANSODE; RATHOD, 2014). Dessa forma, três experimentos foram realizados com agitações magnéticas a 180 rpm, 480 rpm e 720 rpm (análises CL1, CL2 e CL3 da TABELA 4.5) enquanto os outros parâmetros foram mantidos constantes. Esses resultados não foram utilizados para estimação dos parâmetros cinéticos e é estudo preliminar para verificação da limitação por transferência de massa e obtenção da velocidade ótima de rotação. Os resultados estão disponíveis na FIGURA 5.2.



A partir da FIGURA 5.2 é possível observar que as três curvas cinéticas tendem para a mesma condição de equilíbrio de 96% de conversão em 2 horas de reação. Esse comportamento era esperado, pois parâmetros como agitação,

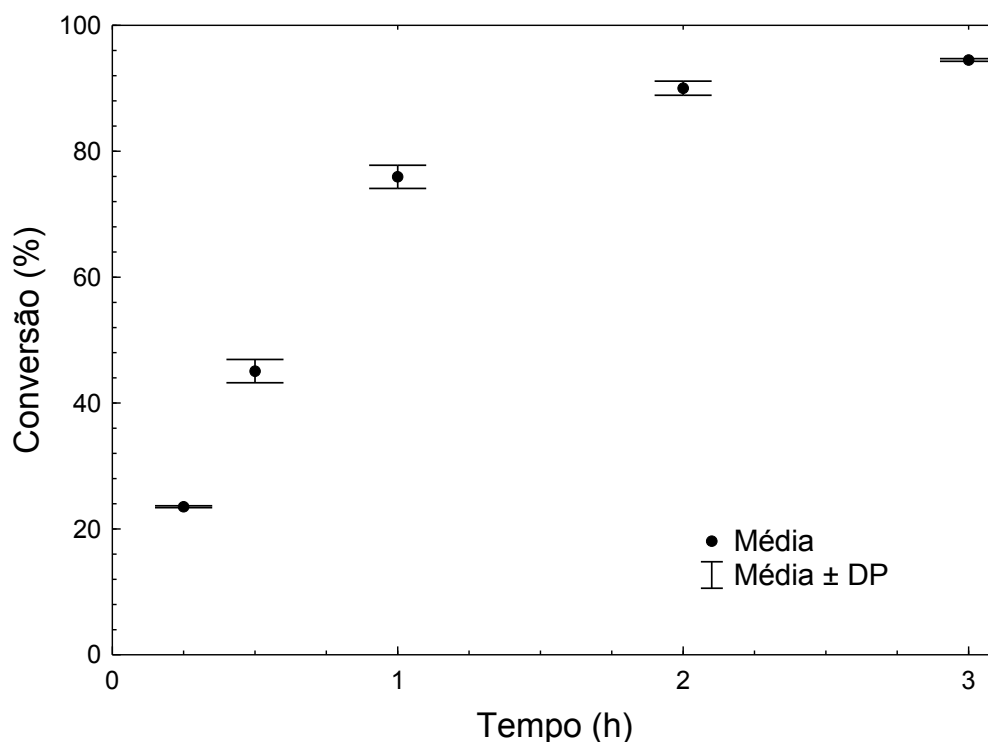
concentração de catalisador afetam apenas a cinética de reação e não modificam a condição de equilíbrio.

Como o aumento da velocidade de agitação aumenta o grau de mistura do sistema e promove o contato entre os substratos e os sítios ativos, a resistência a transferência de massa é reduzida, e portanto a taxa de reação tende a ser maior nessas condições. O sistema reacional apresenta limitação por transferência de massa principalmente devido à viscosidade dos reagentes, que tende a diminuir conforme a temperatura aumenta e à concentração de catalisador, que se for excessiva pode causar aglomerados no meio reacional.

O maior valor de agitação adotado de 720 rpm gera cinética mais rápida, no entanto, foi observado que a enzima encontrava-se fragmentada ao final do tempo de reação devido ao cisalhamento provocado pelo agitador magnético e pelas paredes do reator. Como as enzimas comerciais imobilizadas possuem custo elevado, é interessante manter sua integridade física durante o processo para que elas possam ser reutilizadas. Dessa forma, a agitação de 480 rpm foi adotada para os experimentos seguintes.

Após definição da velocidade de rotação adequada, a triplicata de uma curva cinética genérica foi obtida para determinação do desvio padrão experimental, conforme mostrado na FIGURA 5.3. As condições empregadas foram de 70 °C, razão molar de 1:1, 480 rpm e 1,0 de catalisador (m/m substratos) pois essa é a curva utilizada como base para comparação ao variar os parâmetros de reação. O desvio padrão máximo obtido foi de 1,85%, indicando que os experimentos possuem boa reprodutibilidade.

FIGURA 5.3 - DESVIO PADRÃO EXPERIMENTAL DA ANÁLISE CL5.



. Barras de erro: média \pm desvio padrão. (●) média da triplicata das conversões. Condições da reação: 70 °C, RM 1:1, 480 rpm e 1,0% de catalisador.

5.4.1 Análises da modelagem cinética

Os parâmetro cinéticos do modelo proposto que foram ajustados estão apresentados na TABELA 5.4, onde as incertezas foram determinadas com intervalo de 95% de confiança.

TABELA 5.4 - RESULTADOS DOS PARÂMETROS ESTIMADOS PARA O MODELO CINÉTICO PROPOSTO.

Parâmetro	Unidade	Valor \pm Incerteza*
P_1	$\text{g}_{\text{substrato}}^2/\text{mmol}_{\text{substrato}} \text{mg}_{\text{enzima}} \text{h}$	$0,59 \pm 0,14$
P_2	$\text{g}_{\text{substrato}}^2/\text{mmol}_{\text{substrato}} \text{mg}_{\text{enzima}} \text{h}$	-
Q_1	K^{-1}	$0,089 \pm 0,016$
Q_2	K^{-1}	-
K_1	$\text{g}_{\text{substrato}}^2/\text{mmol}_{\text{substrato}} \text{mmol}_{\text{enzima}}$	-
K_2	$\text{g}_{\text{substrato}}^2/\text{mmol}_{\text{substrato}} \text{mmol}_{\text{enzima}}$	-
K_3	$\text{g}_{\text{substrato}}^2/\text{mmol}_{\text{substrato}} \text{mmol}_{\text{enzima}}$	$1,350 \pm 0,033$
K_4	$\text{g}_{\text{substrato}}^2/\text{mmol}_{\text{substrato}} \text{mmol}_{\text{enzima}}$	$0,90 \pm 0,29$
K_5	$\text{g}_{\text{substrato}}^2/\text{mmol}_{\text{substrato}} \text{mmol}_{\text{enzima}}$	-
K_6	$\text{g}_{\text{substrato}}^2/\text{mmol}_{\text{substrato}} \text{mmol}_{\text{enzima}}$	-
k_c	$\text{g}_{\text{substrato}}/\text{mg}_{\text{enzima}}$	$0,0096 \pm 0,0088$
T_{ref}	K	$322,6 \pm 2,1$

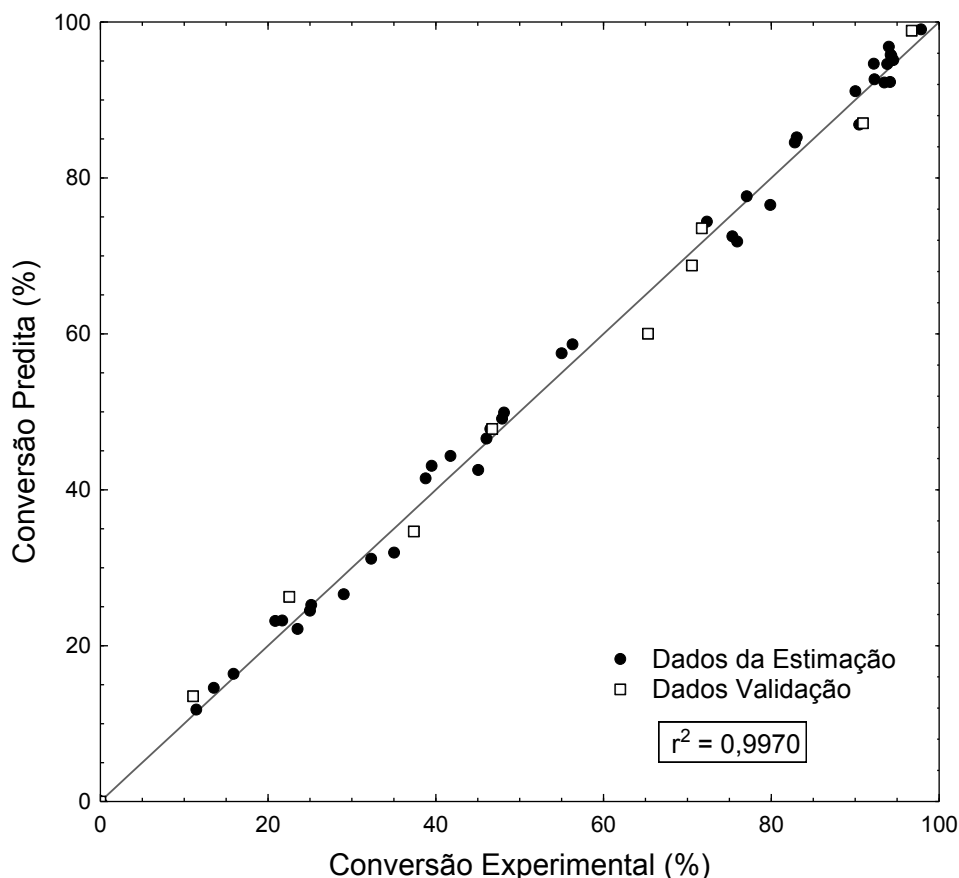
* Incerteza com 95% de confiança.

Alguns parâmetros foram estimados com valores não significativos (muito próximos de zero), e apenas 6 parâmetros foram suficientes para descrever a síntese de palmitato de cetila nas condições experimentais utilizadas.

Como os parâmetros P_2 e Q_2 foram estimados como nulos, há indicação de que a reação inversa de hidrólise é negligenciável. Isso pode ser observado nas condições de equilíbrio experimentais, onde as conversões tendem a valores próximos de 100%, ou seja, não há formação de reagentes durante a reação. Esse efeito pode ser causado pelo *headspace* entre a superfície do volume reacional e a rolha. Como uma pequena quantidade de massa de água é formada (considerando 1 mmol de cada reagente como volume reacional, por exemplo, para cada 480 mg de palmitato de cetila produzido, apenas 18 mg de água é formado), é possível que a maior parte desta água fique no *headspace* devido ao equilíbrio termodinâmico, inibindo a reação de hidrólise.

A discussão detalhada sobre os outros parâmetros será abordada nos itens seguintes.

FIGURA 5.4 - GRÁFICO DE PARIDADE ENTRE CONVERSÃO EXPERIMENTAL E PREDITA.



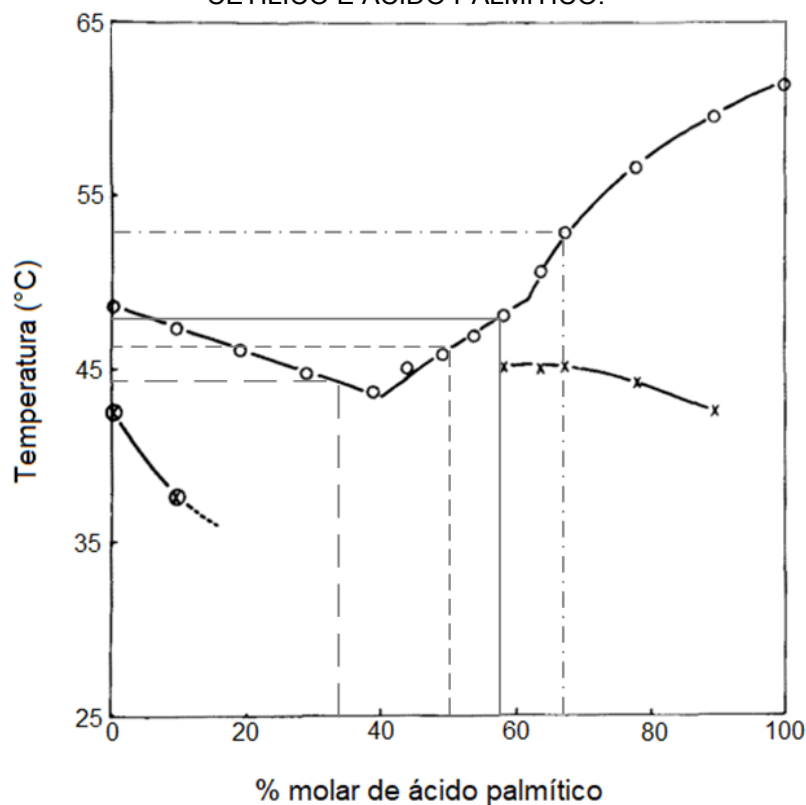
A FIGURA 5.4 apresenta comparação entre conversão experimental e conversão prevista pelo modelo e pode-se observar que todos os pontos experimentais estão próximo da bissetriz de referência, com distribuição simétrica, indicando que o modelo cinético proposto não é tendencioso e apresenta bom ajuste aos dados experimentais, com coeficiente de ajuste $r^2 = 0,9970$.

5.4.2 Influência da temperatura

A temperatura ótima de reações de esterificação depende principalmente do tipo de lipase utilizada e dos reagentes. Geralmente, lipases de *Rhizomucor miehei* possuem atividade ótima em torno de 60 °C e tendem a perder funcionalidade a temperaturas elevadas devido à desativação térmica (KHAN; RATHOD, 2015).

De acordo com o diagrama de fase sólido-líquido para a mistura binária de álcool cetílico e ácido palmítico (AL-MAMUN, 1974), a mistura de reagentes encontra-se na fase líquida em temperaturas acima de 55 °C para todas as razões molares adotadas experimentalmente, conforme indicado na FIGURA 5.5.

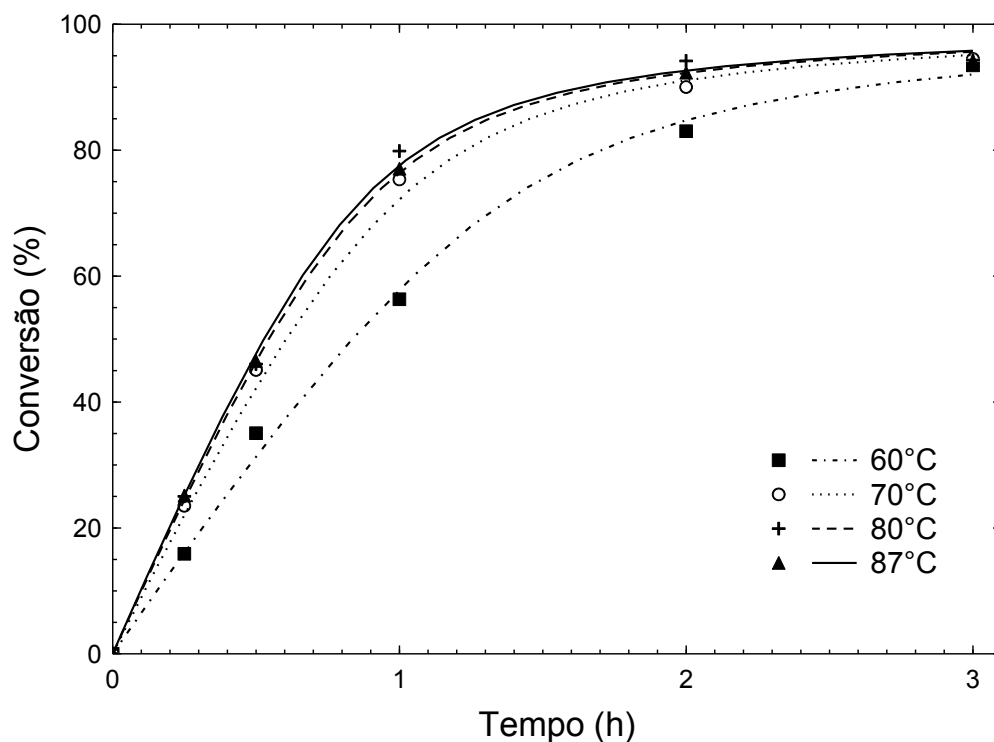
FIGURA 5.5 - DIAGRAMA DE FASE SÓLIDO-LÍQUIDO PARA MISTURA BINÁRIA DE ÁLCOOL CETÍLICO E ÁCIDO PALMÍTICO.



Razões molares álcool:ácido de (— — —) 2:1, (— · — ·) 1:1, (—) 0,75:1 e (— · — ·) 0,5:1.
 FONTE: adaptado de Al-Mamun (1974).

Para analisar a influência da temperatura na catálise promovida pela lipase comercial *Lipozyme RM IM*, quatro curvas cinéticas foram levantadas à 60 °C, 70 °C, 80 °C e 87 °C (análises CL5, CL9, CL10 e CL11 da TABELA 4.5). Os resultados obtidos estão apresentados na FIGURA 5.6.

FIGURA 5.6 - INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA.



Dados experimentais: (■) 60 °C, (○) 70 °C, (+) 80 °C e (▲) 87 °C. Curvas do modelo: (— · — · —) 60 °C, (— · — · —) 70 °C, (— · — · —) 80 °C e (—) 87 °C. Condições de reação: 480 rpm, RM 1:1 e 1,0% de catalisador.

Como a síntese do palmitato de cetila é uma reação endotérmica, o aumento da temperatura tende a favorecer a formação dos produtos. Além disso, para produtos com alto ponto de fusão, as altas temperaturas diminuem a viscosidade do sistema e favorecem a transferência de massa. Experimentalmente, ao elevar a temperatura de 60 °C para 70 °C, houve aumento na conversão de 56,3% para 75,9% em reações de 1 hora. Contudo, não foi observado aumento significativo na conversão para aumentos seguintes de temperatura, onde a 80 °C a conversão se manteve em 79,9% e a 87 °C se manteve em 77,1%.

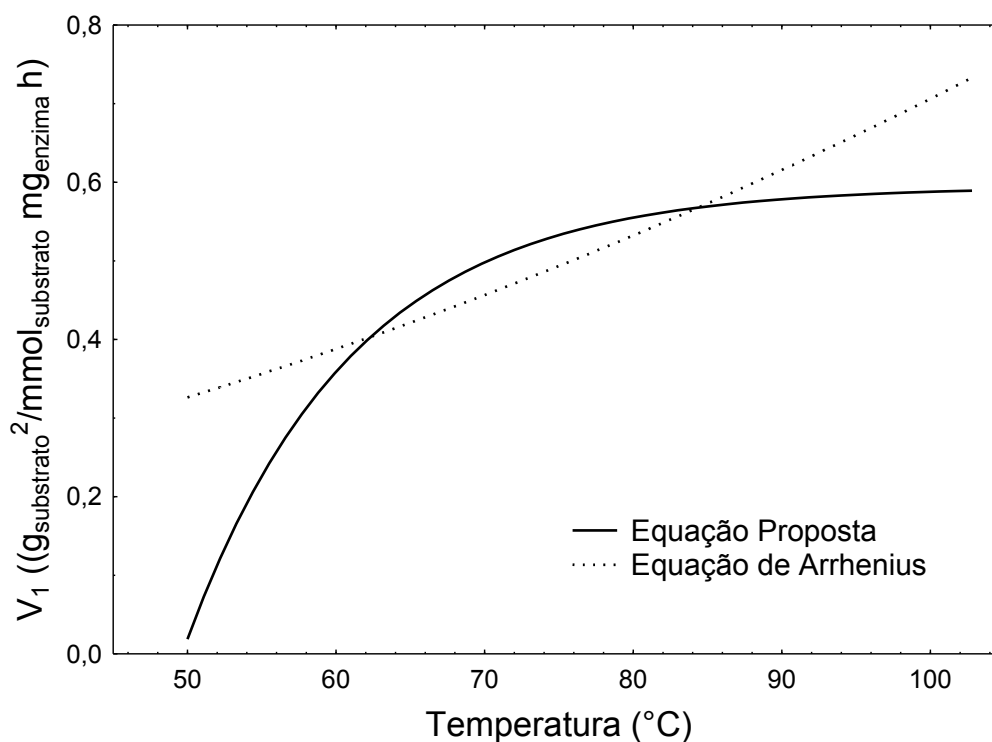
A partir desses resultados, é possível concluir que a temperatura ótima para utilização da enzima *Lipozyme RM IM* na síntese de palmitato de cetila ocorre próximo a 70 °C. A operação em temperaturas maiores que 70 °C consomem maior

quantidade de energia para aquecimento do sistema e o pequeno ganho na conversão pode não compensar os custos extras. No entanto, mesmo para temperaturas em torno de 90 °C a conversão manteve-se elevada e nenhuma desativação térmica foi noticiada, indicando boa estabilidade térmica do catalisador.

A influência da temperatura em sistemas livre de solvente também foi estudada para a esterificação entre ácido octanóico com glicerol utilizando *Lipozyme RM IM* como catalisador, e foi observado que a temperatura de 70 °C é temperatura que fornece os maiores benefícios, considerando consumo de energia e cinética reacional (MORE *et al.*, 2017).

As curvas obtidas a partir do modelo cinético proposto indicam comportamento não linear da conversão em função da temperatura. Experimentalmente, os resultados de conversão obtidos para 80 °C e 87 °C são similares, indicando que nessa faixa de temperatura, V_1 passa a ser constante, ou seja, não varia ao aumentar a temperatura. Se a Equação de Arrhenius fosse utilizada para descrever o comportamento de V_1 em função da temperatura, um aumento contínuo da velocidade seria descrito para temperaturas elevadas (linha tracejada da FIGURA 5.7), não representando adequadamente o sistema real.

FIGURA 5.7 - COMPARAÇÃO DA TAXA DE REAÇÃO DESCRITA PELA EQUAÇÃO DE ARRHENIUS E PELA EQUAÇÃO 4.54.



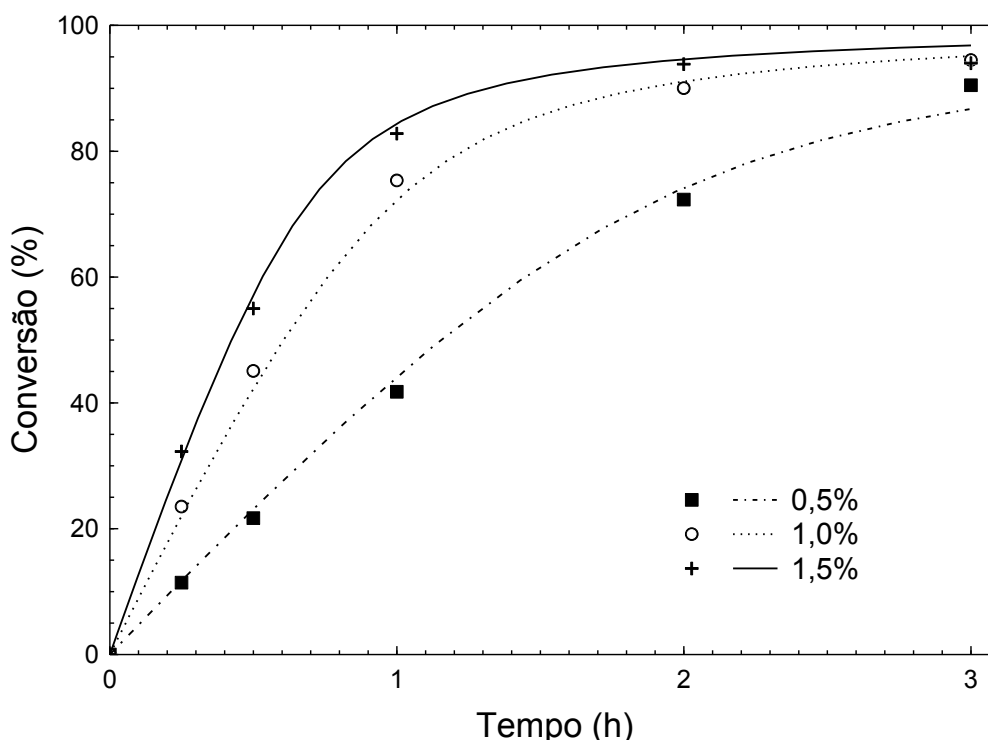
Ao utilizar a Equação 4.54 para descrever o comportamento de V_1 , é possível representar a região onde a velocidade tende a ser constante com o aumento da temperatura (linha contínua da FIGURA 5.7). Nessa região é obtida a temperatura máxima em que a enzima pode ser utilizada, nesse caso, em torno de 87 °C. Embora a nova equação proposta apresente um bom ajuste da velocidade até a máxima temperatura recomendada para utilização da enzima, ela não é capaz de prever o comportamento de desativação térmica. Dessa forma, a Equação 4.54 não deve ser utilizada para temperaturas acima de 87 °C.

O valor estimado para a temperatura de referência foi de $T_{ref} = 322,6 \pm 2,1$ K (aproximadamente 50 °C) representa uma temperatura mínima teórica onde a velocidade de reação seria mínima. De fato, nessa temperatura o sistema começa a ser limitado pelo ponto de fusão da mistura dos reagentes, conforme FIGURA 5.5. Abaixo de 50 °C a mistura dos reagentes encontra-se na região de transição de fase líquido-sólido, inviabilizando o andamento da reação.

A equação proposta (Equação 4.54) representa um avanço no estudo da modelagem cinética de catálises enzimáticas, pois é capaz superar uma limitação encontrada até então por diversos autores para descrever com precisão a velocidade de reação em função da temperatura, conforme discutido no item 3.2.3. Apesar de não prever o comportamento reacional de desativação térmica, ou seja, de não descrever o decaimento da velocidade ao aumentar a temperatura, pode ser utilizada até a temperatura máxima indicada para utilização da enzima comercial, diferentemente da Equação de Arrhenius. Nesse caso, a recomendação é que seja empregada apenas para temperaturas claramente distantes da temperatura máxima de operação (BISSWANGER, 2002).

5.4.3 Influência da concentração de catalisador

Para entender como a concentração de catalisador afeta a síntese do palmitato de cetila, cinco experimentos foram realizados usando 0,5%, 1,0% e 1,5% de catalisador (% em relação à massa total dos substratos), conforme análises CL4, CL5 e CL6 da TABELA 4.5. Para essas análises as demais condições foram mantidas constantes, sendo temperatura de 70 °C, razão molar álcool:ácido de 1:1 e agitação magnética de 480 rpm. Os resultados estão apresentados na FIGURA 5.8.

FIGURA 5.8 - INFLUÊNCIA DA CONCENTRAÇÃO DE *LIPOZYME RM IM*.

Dados experimentais: (■) 0,5%, (○) 1,0% e (+) 1,5%. Curvas do modelo: (-.-.-) 0,5%, (-.-.-) 1,0% e (—) 1,5%. Condições de reação: 70 °C, RM 1:1 e 480 rpm.

Em geral, a taxa de reações enzimáticas é diretamente dependente do número de sítios ativos da enzima por unidade de volume. Dessa forma, ao aumentar a concentração de catalisador, há um aumento nas chances de colisão entre substratos e enzima, o que tende a aumentar a taxa de reação (MORE *et al.*, 2017). A partir da FIGURA 5.8 é possível observar que a conversão aumenta conforme a concentração de *Lipozyme RM IM* no meio aumenta, atingindo em média 95% de conversão para as concentrações de 1,0% e 1,5% em três horas de reação. No entanto o aumento de conversão não é diretamente proporcional ao aumento da concentração. Ao analisar os resultados para 1 hora de reação, a conversão passou de 41,7% para 75,9% ao aumentar a concentração de 0,5% para 1,0%, mas a conversão aumentou apenas até 82,8% quando a concentração de 1,5% foi utilizada.

O comportamento não linear da conversão em função da concentração de enzima pode ser atribuído a quantidades excessivas de catalisador no reator, que dificultam o acesso dos substratos aos sítios ativos, inibindo a transferência de massa do sistema. Como as enzimas comerciais imobilizadas geralmente são de custo elevado, dosagens excessivas podem reduzir a eficiência do sistema e aumentar os

custos de produção (BANSODE; RATHOD, 2014; DENG et al., 2011; SERRANO-ARNALDOS et al., 2016). Dessa forma, conclui-se que não é vantajoso aumentar indiscriminadamente a concentração de catalisador com objetivo de aumentar a taxa de reação.

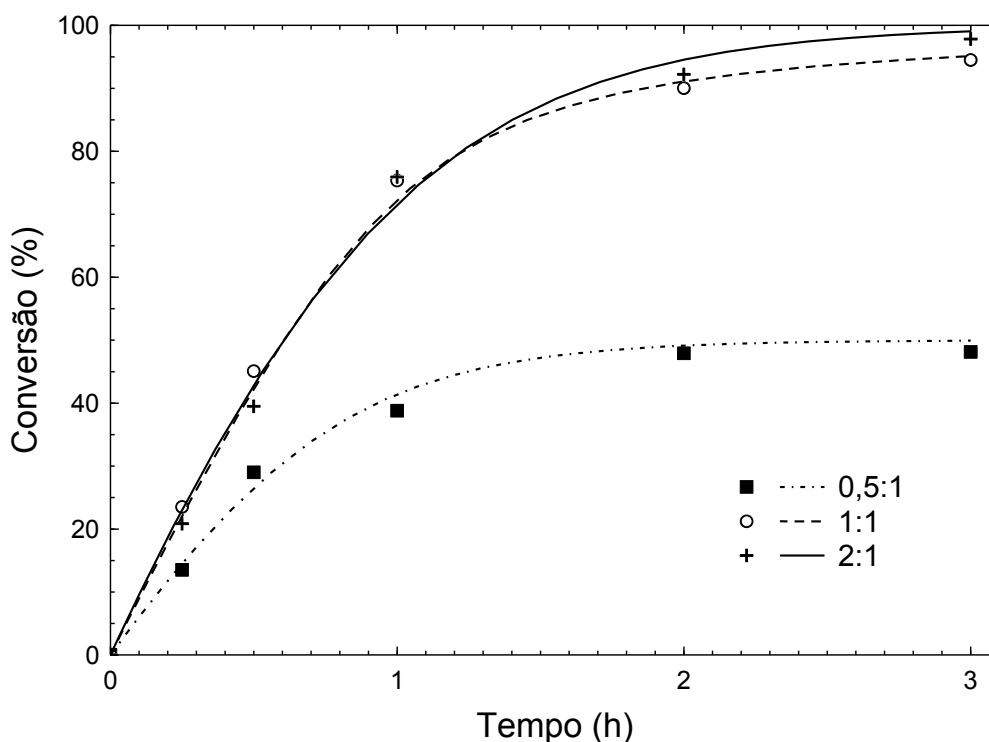
Esta hipótese pode ser confirmada pelo ajuste obtido para o modelo matemático proposto. A Equação 4.43 corrige, a partir da constante k_c , concentração total de enzimas, e passa a considerar a concentração de enzimas que realmente está disponível para realizar reação química, devido a formação de aglomerados. O ajuste do modelo aos dados experimentais estimou $k_c = 0.0096 \pm 0.0088 \text{ g}_{\text{substrato}}/\text{mg}_{\text{enzima}}$. Se comparado ao valor dos outros parâmetros da TABELA 5.4, ele é importante para ajuste do modelo. Quando é removido, o modelo não é capaz de ajustar com boa precisão os dados referentes à concentração de catalisador, indicando que realmente há limitação de transferência de massa do sistema quando quantidades excessivas de catalisador são empregadas. Dessa forma, a concentração mais viável de *Lipozyme RM IM* é de 1,0% (massa enzima/massa dos substratos), considerando aspectos econômicos e cinéticos.

5.4.4 Influência da razão molar

Para estudo da influência da proporção entre os reagentes na cinética reacional, três experimentos foram realizados a diferentes razões molares álcool:ácido, sendo 0,5:1, 1:1 e 2:1, conforme análises CL5, CL7 e CL8 da TABELA 4.5. Para essas análises as demais condições foram mantidas constantes, sendo temperatura de 70 °C, agitação magnética de 480 rpm e 1,0% (m/m substratos) de concentração de *Lipozyme RM IM*. Os resultados estão disponíveis na FIGURA 5.9.

As curvas cinéticas obtidas para as razões molares de 1:1 e 2:1 apenas se diferenciam próximo da região de equilíbrio, onde a conversão passa de 94,5% para 97,8%, respectivamente. Esse comportamento é esperado, pois segundo o princípio de Le Chatelier, o excesso de um dos reagentes desloca o equilíbrio no sentido dos produtos, aumentando a conversão da reação. A curva de razão molar 0,5:1 atinge conversão de 48,1% na condição de equilíbrio, valor muito próximo da conversão máxima de 50% que seria obtido se todo o álcool cetílico disponível no meio fosse consumido.

FIGURA 5.9 - INFLUÊNCIA DA RAZÃO MOLAR ÁLCOOL:ÁCIDO.



Dados experimentais (■) 0,5:1, (○) 1:1 e (+) 2:1. Curvas do modelo: (- - -) 0,5:1, (- - -) 1:1 e (—) 2:1. Condições de reação: 70 °C, 480 rpm e 1,0% de catalisador.

Ao analisar os parâmetros obtidos ao ajustar o modelo cinético aos dados experimentais (TABELA 5.4), o valor estimado para K_1 não foi significativo, sugerindo que não há inibição devido à ocupação sítios ativos por uma molécula de cada reagente. O mesmo resultado foi obtido para K_2 , onde nenhuma inibição é causada por uma molécula de cada produto em locais ativos.

Adicionalmente, o modelo cinético indica uma inibição competitiva de segunda ordem de reagentes por locais ativos de enzimas, atribuindo valores substanciais para as constantes K_3 e K_4 , sendo que o parâmetro $K_3 = 1,350 \pm 0,033 \text{ g}_{\text{substrato}}^2/\text{mmol}_{\text{substrato}}\text{mmol}_{\text{enzima}}$ representa a inibição provocada pelo álcool cetílico e $K_4 = 0,90 \pm 0,29 \text{ g}_{\text{substrato}}^2/\text{mmol}_{\text{substrato}}\text{mmol}_{\text{enzima}}$ representa a inibição causada pelo ácido palmítico. A inibição provocada pelo álcool cetílico pode ser responsável pelo comportamento similar das curvas cinéticas de razão molar 1:1 e 2:1 para tempos inferiores a 2 horas. O excesso de álcool no meio reacional pode estar ocupando os sítios ativos ao invés de deslocar o equilíbrio no sentido de formação de produtos, aproximando a curva cinética de razão molar 2:1 da curva de razão molar 1:1. Dessa forma, conclui-se que a operação utilizando excesso de um

dos reagentes não compensa os gastos com aquisição de reagentes e purificação do produto ao final da reação, tornando a razão molar estequiométrica de 1:1 mais indicada para síntese do palmitato de cetila.

O mesmo fenômeno de inibição provocada pelo álcool foi observado para a síntese de oleato de cetila (DENG et al., 2011; RANI et al., 2015). Esse comportamento é dado pela formação de complexo ternário inativo e alta polaridade de álcool, que sofre interações hidrófilas com a camada limite aquosa na superfície da lipase causando modificações em sua estrutura proteica (SYAMSUL et al., 2010).

Ao analisar a FIGURA 5.9, é possível notar que não há queda na velocidade de reação nas regiões de maiores conversões, onde a concentração dos produtos é maior. Se houvesse inibição pelos produtos, seria possível observar (principalmente nos experimentos onde a alimentação dos reagentes é estequiométrica, ou seja, onde não há excesso de nenhum dos reagentes), uma queda na velocidade para tempos mais longos de reação. Esse resultado é verificado pelo ajuste dos parâmetros K_5 e K_6 do modelo cinético, que foram estimados como nulos, confirmando a hipótese de que não há inibição os ativos por duas moléculas do mesmo produto.

5.4.5 Validação do modelo cinético

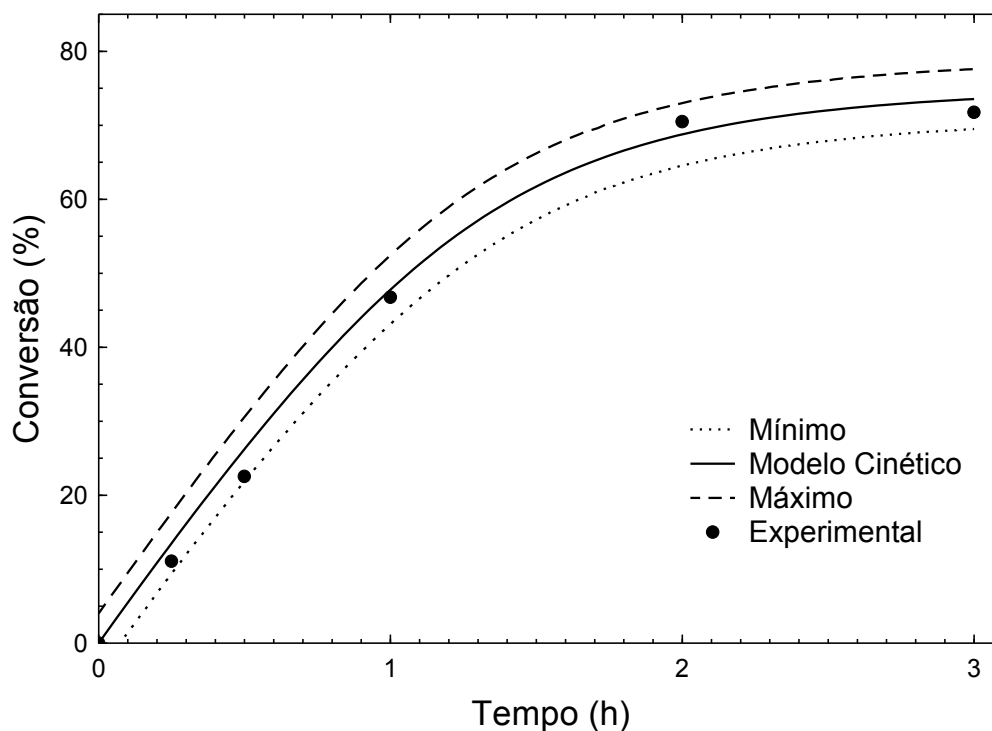
Dois levantamentos cinéticos foram feitos experimentalmente em condições distintas das que foram utilizadas para estimação dos parâmetros com objetivo de testar a capacidade de predição do modelo. Para isso, a análise CL12 foi conduzida a 65 °C, 0,75% de catalisador e razão molar álcool:ácido de 0,75:1 e a análise CL13 foi conduzida a 65 °C, 2,0% de catalisador e razão molar álcool:ácido de 2,5:1. A temperatura da análise CL13 não foi variada para valores além da faixa utilizada para estimação dos parâmetros, pois a temperatura mínima está limitada pela fusão dos reagentes e a temperatura máxima está limitada pela desativação térmica da enzima, que ocorrem em torno dos 87 °C. Como não há vantagens em conduzir a reação fora desta faixa de temperatura, optou-se por manter a análise CL13 na temperatura intermediária de 65 °C. Em ambas as análises a agitação magnética foi mantida em 480 rpm, pois esse parâmetro é fixo e sua variação não é contemplada pelo modelo cinético.

A FIGURA 5.10 exibe os resultados da análise CL12, e a FIGURA 5.11 exibe os resultados da análise CL13. Nessas figuras são apresentadas as regiões de confiança do modelo, obtidas com intervalo de confiança de 95%. É possível observar a boa capacidade de predição do modelo, tanto na faixa de condições experimentais utilizadas quanto fora dela, pois todos os pontos experimentais estão próximos da curva de predição do modelo e dentro da região de confiança.

O desvio quadrático médio residual (RMSD_r) obtido a partir dos dados usados para estimação dos parâmetros, ou seja, calculado a partir da Equação 4.58, é de 1,867%. Esse valor é próximo do valor de 2,760% obtido para o desvio quadrático médio de predição (RMSD_p), calculado a partir da Equação 4.59.

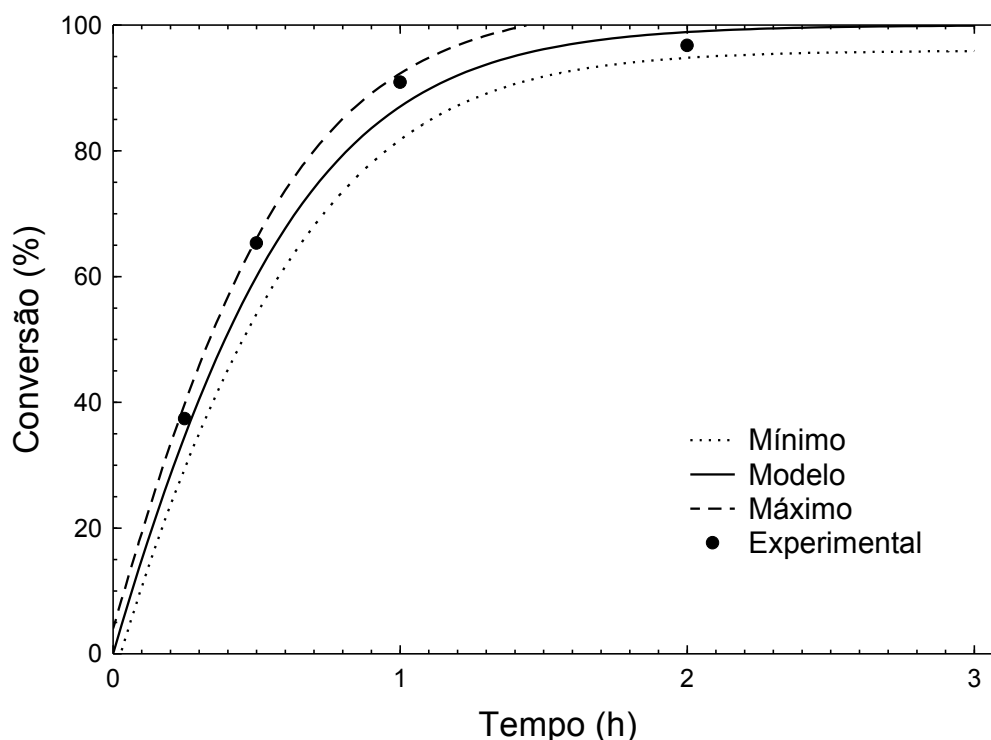
O desvio padrão estimado do modelo cinético é de 2,003%, que é ligeiramente maior que o desvio padrão experimental de 1,85%, indicando que grande parte do desvio é causado por incertezas experimentais e não por imprecisão do modelo.

FIGURA 5.10 - VALIDAÇÃO PARA CONDIÇÕES DENTRO DA FAIXA DE CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E REGIÃO DE INCERTEZA DE PREDIÇÃO DO MODELO A 95% DE CONFIANÇA.



(●) Dados experimentais, (—) curva do modelo, (---) curva de mínimo e (---) curva de máximo. Condições de reação: 65 °C, 0,75% de catalisador, RM 0,75:1 e 480 rpm.

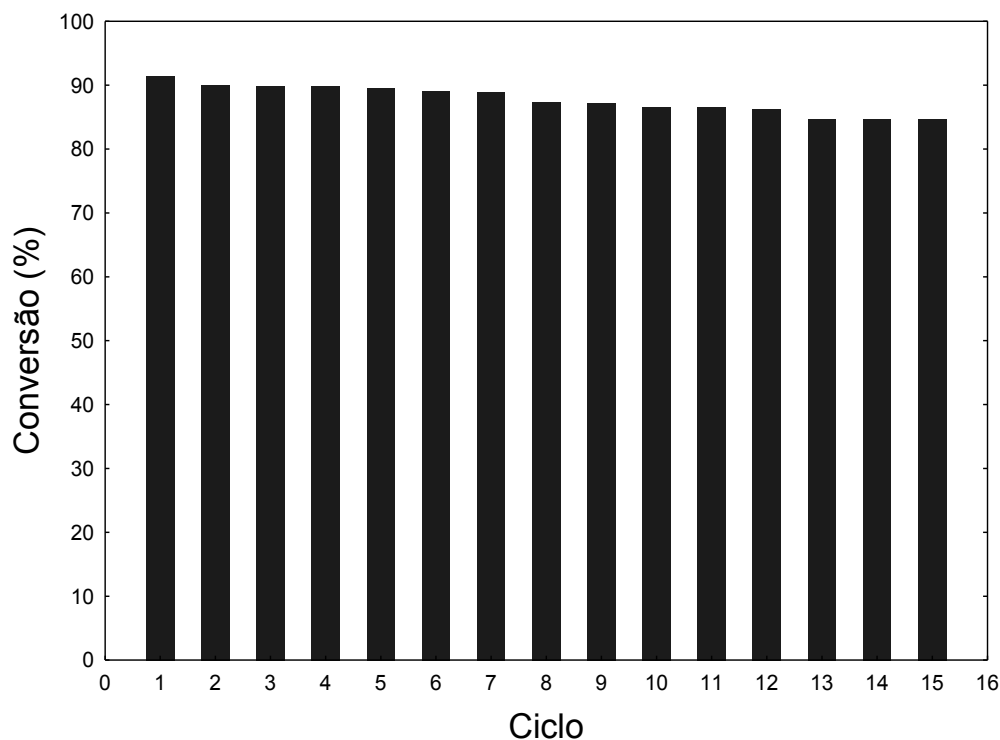
FIGURA 5.11 - VALIDAÇÃO PARA CONDIÇÕES DENTRO DA FAIXA DE CONDIÇÕES EXPERIMENTAIS E REGIÃO DE INCERTEZA DE PREDIÇÃO DO MODELO A 95% DE CONFIANÇA.



(●) Dados experimentais, (—) curva do modelo, (---) curva de mínimo e (— —) curva de máximo. Condições de reação: 65 °C, 2,0% de catalisador, RM 2,5:1 e 480 rpm.

5.5 REUSO DA ENZIMA COMERCIAL IMOBILIZADA

A possibilidade de reciclagem de enzimas comerciais é um importante fator a ser estudado, pois a reutilização eficiente desses catalisadores permite redução de custos do processo industrial. O procedimento de recuperação da enzima do meio reacional está descrito no item 4.3.2. As condições adotadas para essa análise foram 70 °C, razão molar álcool:ácido de 1:1, 2 horas de reação, 1% de catalisador (m/m substratos) e agitação mecânica de 900 rpm. Nessas condições, a conversão da reação é de 90% quando enzima nova é utilizada. Como esta condição está longe do equilíbrio, é possível observar com clareza a redução da atividade enzimática, e consequentemente da conversão ao longo dos ciclos. Os resultados estão exibidos na FIGURA 5.12.

FIGURA 5.12 - ESTUDO DO REUSO DA ENZIMA COMERCIAL *LIPOZYME RM IM*.

Condições de reação: agitação mecânica de 900 rpm, RM 1:1, 1,0% de catalisador e 2 horas de reação.

A enzima comercial imobilizada foi reciclada 15 vezes com êxito em reações de batelada. Após os 15 ciclos reacionais, a conversão caiu apenas 6,8%, passando de 91,4% para 84,6%, indicando alta estabilidade e viabilidade do processo de purificação, separação e reciclagem da enzima. A alta estabilidade da enzima pode ser atribuída ao baixo teor de água presente no meio (RADZI et al., 2005).

A perda de atividade observada ocorre principalmente devido a fragmentação da enzima e do suporte durante a agitação mecânica e durante o processo de filtração. Observou-se experimentalmente que pouca ou nenhuma desativação é atribuída à desativação térmica ou envenenamento do catalisador no período de teste estudado.

5.6 CROMATOGRAFIA EM FASE GÁS

Duas amostras foram analisadas, sendo a primeira contendo a mistura de reagentes e a segunda amostra contendo produtos da reação.

O cromatograma obtido para os reagentes está apresentado no APÊNDICE I – CROMATOGRAMA REAGENTES, onde o pico com tempo de retenção de 9,8 min corresponde ao ácido palmítico e o pico com tempo de retenção 10,6 min corresponde ao álcool cetílico.

A segunda amostra analisada referente aos produtos de reação e tem como objetivo validar qualitativamente o resultado obtido por titulação. As condições experimentais utilizadas estão descritas no item 4.4.3, e a conversão obtida por titulação para essa reação foi de 94,2%. Dessa forma, ao analisar essa amostra por cromatografia em fase gás, espera-se obter majoritariamente o pico referente ao éster palmitato de cetila e dois picos menores referentes aos reagentes restantes na amostra. O APÊNDICE II – CROMATOGRAMA PRODUTOS exibe o cromatograma obtido para o produto da reação, onde os picos de 9,8 min e 10,6 min correspondem aos reagentes ácido palmítico e álcool cetílico que não reagiram, respectivamente. O pico com tempo de retenção 22,9 min refere-se ao éster palmitato de cetila produzido durante a reação.

Conforme era esperado, o pico referente ao éster é significativamente maior que o pico referente aos reagentes, confirmando que quase a totalidade da amostra é composta de éster, assim como era previsto pelo resultado titulométrico.

6 CONCLUSÕES

A síntese do palmitato de cetila livre de solventes foi estudada sob catálise de três tipos diferentes de catalisador. A catálise promovida pelo ácido sulfúrico se mostrou eficiente, atingindo aproximadamente 100% de conversão após 5 horas de reação a 80 °C, com razão molar 1:1 entre os reagentes e 1% de catalisador. Embora seja um processo eficiente, a catálise homogênea gera custos adicionais de purificação do produto e recuperação do catalisador ao final da reação. Adicionalmente, o ácido sulfúrico é nocivo a saúde humana, e portanto não é indicado em processos industriais de síntese de produtos que são destinados ao consumo humano, como é o caso do palmitato de cetila, muito utilizado em formulações de produtos de higiene pessoal e maquiagens.

A catálise promovida por lipases provenientes de sementes oleaginosas de mamona, soja, grão-de-bico, quinoa, girassol e abóbora foi estudada sob as mais diferentes condições de temperatura, razão molar. Após testes preliminares, a semente de mamona se mostrou mais promissora para catálise de reações de esterificação. No entanto, nenhum resultado satisfatório foi obtido quando foi utilizada na síntese de ésteres de cadeia longa. Mesmo após extração do óleo residual da mamona, a máxima conversão obtida para a esterificação foi de apenas 10% em reações de 30 horas.

A enzima comercial imobilizada *Lipozyme RM IM* se mostrou eficiente para a síntese de palmitato de cetila. A reação atinge conversões em torno de 95% para condições brandas de temperatura, próximas de 70 °C, razões molares estequiométricas, o que dispensa purificação do produto ao final da reação, e apenas 1,0% de catalisador em relação à massa dos substratos.

O modelo cinético enzimático baseado no mecanismo Bi bi randômico sequencial apresentou bom ajuste aos dados experimentais, com $RMSD_r$ de 1,867%, utilizando apenas 6 parâmetros cinéticos. A equação proposta para cálculo da velocidade de reação em função da temperatura foi capaz de prever o comportamento da cinética reacional até a temperatura máxima de operação, ou seja, é capaz de indicar a temperatura de início da desativação térmica. O modelo mostrou ainda boa capacidade preditiva do comportamento reacional em condições distintas das utilizadas experimentalmente, com desvio padrão estimado de 2,003%.

A partir dos resultados experimentais e do ajuste obtido do modelo cinético, foi possível concluir ainda que a concentração de catalisador não influencia diretamente na taxa de reação, pois quantidades excessivas de enzimas imobilizadas formam aglomerados e reduzem a transferência de massa do sistema.

Apesar das enzimas comerciais possuírem custo elevado, elas possuem alta estabilidade térmica e podem ser reutilizadas. No sistema estudado, a *Lipozyme RM IM* foi reciclada em reações de 2 horas, a 70 °C e agitação mecânica de 900 rpm, com redução de apenas 6,8% de conversão após 15 ciclos de reuso.

Todos os experimentos foram conduzidos em sistemas livre de qualquer tipo de solvente, o que torna o processo amigável ao meio ambiente, reduzem o consumo de energia, eliminam necessidade disposição final de produtos residuais e possibilitam uso de equipamentos e reatores com volume reduzido. Além dessas vantagens, há também economia associada a compra do solvente e operações unitárias de separação do solvente, o que torna os sistemas livre de solvente mais atrativos financeiramente e ambientalmente.

6.1 RECOMENDAÇÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudo da síntese de outros ésteres de interesse industrial utilizando o mesmo sistema reacional e a *Lipozyme RM IM* como catalisador.
- Investigar a desativação térmica da *Lipozyme RM IM* realizando experimentos com temperaturas superiores a 90 °C.
- Conduzir a reação em processo contínuo com leito de enzima comercial.
- Propor modificações no modelo cinético que sejam capazes de descrever a variação do grau de mistura do sistema.
- Ampliação de escala do processo.

REFERÊNCIAS

ABIHPEC. **Panorama do Setor de HPPC**. p. 14, 2016.

AL-ARAFI, N. M.; SALIMON, J. Synthesis of long chain wax ester, using the bronsted acidic ionic liquid N-methyl-2-pyrrolidonium methyl sulphate ([NMP][CH₃SO₃]). **Research Journal of Applied Sciences**, v. 6, n. 6, p. 361–365, 2011.

AL-ARAFI, N.; SALIMON, J. Production of Oleic Acid Based Wax Ester Using Acidic Homogeneous Catalysts. **E-Journal of Chemistry**, v. 9, n. 1, p. 99–106, 2012.

AL-MAMUN, M. A. Study of Binary Systems of Long Chain Alcohols and Acids. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 51, p. 229–233, 1974.

BAINY, E. M. et al. Mathematical Modeling of Fish Burguer Baking Using Fractional Calculus. **Thermal Science**, v. 21, n. 1A, p. 41–50, 2017.

BANSODE, S. R.; RATHOD, V. K. Ultrasound assisted lipase catalysed synthesis of isoamyl butyrate. **Process Biochemistry**, v. 49, p. 1297–1303, 2014.

BEZBRADICA, D. et al. Enzymatic Syntheses of Esters - Green Chemistry for Valuable Food, Fuel and Fine Chemicals. **Current Organic Chemistry**, v. 21, n. 2, p. 104–138, 2017.

BISSWANGER, H. **Enzyme Kinetics Principles and methods**. Weinheim, Germany: WILEY-VCH, 2002.

CANAKCI, M.; VAN GERPEN, J. Biodiesel Production from Oils and Fats with High Free Fatty Acids. **Transactions of the ASAE**, v. 44, n. 6, p. 1429–1436, 2001.

CAVALCANTI, E. D. C. et al. Acetone powder from dormant seeds of *Ricinus communis* L: Lipase activity and presence of toxic and allergenic compounds. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 137–140, n. 1–12, p. 57–65, 2007.

CHEN, H. C. et al. Optimization of Enzymatic Synthesis of Cetyl 2-Ethylhexanoate by Novozym® 435. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 88, n. 12, p. 1917–1923, 2011.

DENG, L. et al. Synthesis of Wax Esters by Lipase-catalyzed Esterification with Immobilized Lipase from *Candida* sp. 99-125. **Chinese Journal of Chemical Engineering**, v. 19, n. 6, p. 978–982, 2011.

FOGLER, H. S. **Elements of Chemical Reaction Engineering**. Third ed. New Jersey: Prentice Hall PTR, 1999.

FRIESEN, V. C. et al. Modeling Heavy Metal Sorption Kinetics Using Fractional Calculus. **Mathematical Problems in Engineering**, 2015.

GANGULY, S.; NANDI, S. Process optimization of lipase catalyzed synthesis of diesters in a packed bed reactor. **Biochemical Engineering Journal**, v. 102, p. 2–5, 2015.

GARCIA, T. et al. Kinetic model for the esterification of oleic acid and cetyl alcohol using an immobilized lipase as catalyst. **Chemical Engineering Science**, v. 55, n. 8, p. 1411–1423, 2000.

GRAESER, V. **Esterificação Não Catalítica de Ácido Láurico com Etanol Anidro: Cinéticas e Conversão de Equilíbrio**. [s.l.] Universidade Federal do Paraná, 2013.

GUNCHEVA, M. H.; ZHIRYAKOVA, D. High-yield synthesis of wax esters catalysed by modified *Candida rugosa* lipase. **Biotechnology Letters**, v. 30, n. 3, p. 509–512, 2008.

GUNSTONE, F. D. Enzymes as biocatalysts in the modification of natural lipids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 79, p. 1535–1549, 1999.

GUNSTONE, F. D.; HARWOOD, J. L.; DIJKSTRA, A. J. (EDS.). **The Lipid Handbook**. Third ed. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2007. v. 53

GUPTA, J.; AGARWAL, M.; DALAI, A. K. Optimization of biodiesel production from mixture of edible and nonedible vegetable oils. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 8, p. 112–120, 2016.

HARDY, L. Future of beauty is looking good. **The Beauty Economy**, v. 417, p. 3, 2016.

ISONO, Y.; NABETANI, H.; NAKAJIMA, M. Wax ester synthesis in a membrane reactor with lipase-surfactant complex in hexane. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 72, n. 8, p. 887–890, 1995.

JAIN, S.; SHARMA, M. P. Kinetics of acid base catalyzed transesterification of *Jatropha curcas* oil. **Bioresource Technology**, v. 101, p. 7701–7706, 2010.

KHAN, N. R.; JADHAV, S. V.; RATHOD, V. K. Lipase catalysed synthesis of cetyl oleate using ultrasound: Optimisation and kinetic studies. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 27, p. 522–529, 2015.

KHAN, N. R.; RATHOD, V. K. Enzyme catalyzed synthesis of cosmetic esters and its intensification: A review. **Process Biochemistry**, v. 50, p. 1793–1806, 2015.

KUO, C. H. et al. High yield of wax ester synthesized from cetyl alcohol and octanoic acid by lipozyme RMIM and novozym 435. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 13, n. 9, p. 11694–11704, 2012.

LEÃO, L. S. **Estudo Empírico e Cinético da Esterificação de Ácidos Graxos Saturados Sobre o Ácido Nióbico**. [s.l.] Universidade Federal do Rio de Janeiro, 2009.

ŁOPACIUK, A.; ŁOBODA, M. Global Beauty Industry Trends in the 21st Century. **Active Citizenship by Knowledge Management & Innovation**, p. 1079–1087, 2013.

LOPES, D. B.; DUARTE, M. C. T.; MACEDO, G. A. Biosynthesis of Oleyl Oleate Wax Ester by Non-commercial Lipase. **Food Science and Biotechnology**, v. 20, n. 5, p.

1203–1209, 2011.

MADANKAR, C. S.; PRADHAN, S.; NAIK, S. N. Parametric study of reactive extraction of castor seed (*Ricinus communis* L.) for methyl ester production and its potential use as bio lubricant. **Industrial Crops and Products**, v. 43, n. 1, p. 283–290, 2013.

MANTRI, K.; KOMURA, K.; SUGI, Y. ZrOCl₂·8H₂O catalysts for the esterification of long chain aliphatic carboxylic acids and alcohols. The enhancement of catalytic performance by supporting on ordered mesoporous silica. **Green Chemistry**, v. 7, n. 9, p. 677–682, 2005.

MARANGONI, A. G. **ENZYME KINETICS A Modern Approach**. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2003.

MONTIEL, M. C. et al. Synthesis of cetyl ricinoleate catalyzed by immobilized Lipozyme CalB lipase in a solvent-free system. **Catalysis Today**, v. 255, p. 49–53, 2015.

MORE, S. B.; WAGHMARE, J. T.; GOGATE, P. R. Ultrasound pretreatment as a novel approach for intensification of lipase catalyzed esterification of tricaprylin. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 36, p. 253–261, 2017.

OLIVEIRA, D. et al. Assessment of two immobilized lipases activity treated in compressed fluids. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 38, p. 373–382, 2006.

PAPPAS, A. (ED.). **Lipid and Skin Health**. New York: Springer, 2015.

PAYE, M.; BAREL, A. O.; MAIBACH, H. I. (EDS.). **Handbook of Cosmetic Science and Technology**. Third ed. New York: Informa Healthcare USA, 2009.

PETERSSON, A. E. V.; ADLERCREUTZ, P.; MATTIASSON, B. A Water Activity Control System for Enzymatic Reactions in Organic Media. **Biotechnology and Bioengineering**, v. 97, n. 2, p. 235–241, 2007.

PETERSSON, A. E. V. et al. Cleaner Production: Technologies and Tools for Resource Efficient Production. p. 277–283, 2007.

PRATHER, K. **Using Whole Cells as Biocatalysts: Why/When, Growth vs Conversion (Screening)** MIT Department of Chemical Engineering, , 2004.

RADZI, S. M. et al. High performance enzymatic synthesis of oleyl oleate using immobilised lipase from *Candida antartica*. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 8, n. 3, p. 291–298, 2005.

RANI, K. N. P. et al. Kinetics of enzymatic esterification of oleic acid and decanol for wax ester and evaluation of its physico-chemical properties. **Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers**, v. 55, p. 12–16, 2015.

RODRIGUES, R. C.; FERNANDEZ-LAFUENTE, R. Lipase from *Rhizomucor miehei* as a biocatalyst in fats and oils modification. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 66, p. 15–32, 2010.

SERRANO-ARNALDOS, M. et al. Solvent-free enzymatic production of high quality cetyl esters. **Bioprocess and Biosystems Engineering**, v. 39, n. 4, p. 641–649, 2016.

SMITH, J. G. **Organic Chemistry**. Third ed. New York: Mc Graw Hill, 2011.

SRIVASTAVA, A. et al. Studies on *Ricinus* Lipase Enzyme Isolated from Castor Seeds. **Oriental Journal of Chemistry**, v. 32, n. 2, p. 1235–1247, 2016.

STERGIOU, P.-Y. et al. Advances in lipase-catalyzed esterification reactions. **Biotechnology Advances**, v. 31, p. 1846–1859, 2013.

SUNITHA, S. et al. Liquid-liquid biphasic synthesis of long chain wax esters using the Lewis acidic ionic liquid choline chloride.2ZnCl₂. **Tetrahedron Letters**, v. 48, n. 39, p. 6962–6965, 2007.

SYAMSUL, K. M. W. et al. Green Synthesis of Lauryl Palmitate via Lipase-Catalyzed Reaction. **World Applied Sciences Journal**, v. 11, n. 4, p. 401–407, 2010.

TOMKE, P. D.; RATHOD, V. K. Enzyme as biocatalyst for synthesis of octyl ethanoate using acoustic cavitation: Optimization and kinetic study. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 7, p. 145–153, 2016.

TÜTER, M. Castor bean lipase as a biocatalyst in the esterification of fatty acids to glycerol. **Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 75, n. 3, p. 417–420, 1998.

VILLENEUVE, P. Plant lipases and their applications in oils and fats modification. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 105, p. 308–317, 2003.

VILLENEUVE, P. et al. Lipase-catalyzed synthesis of canola phytosterols oleate esters as cholesterol lowering agents. **Enzyme and Microbial Technology**, v. 37, n. 1, p. 150–155, 2005.

VOLL, F. A. P. et al. Kinetic Modeling of Solvent-Free Lipase-Catalyzed Partial Hydrolysis of Palm Oil. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, p. 1121–1142, 2012.

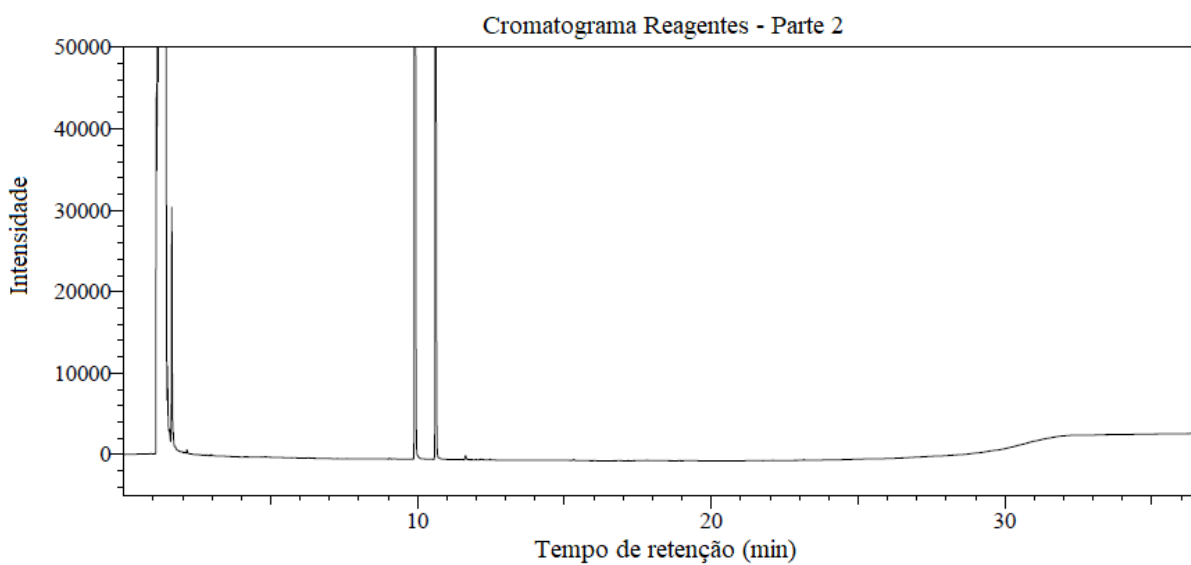
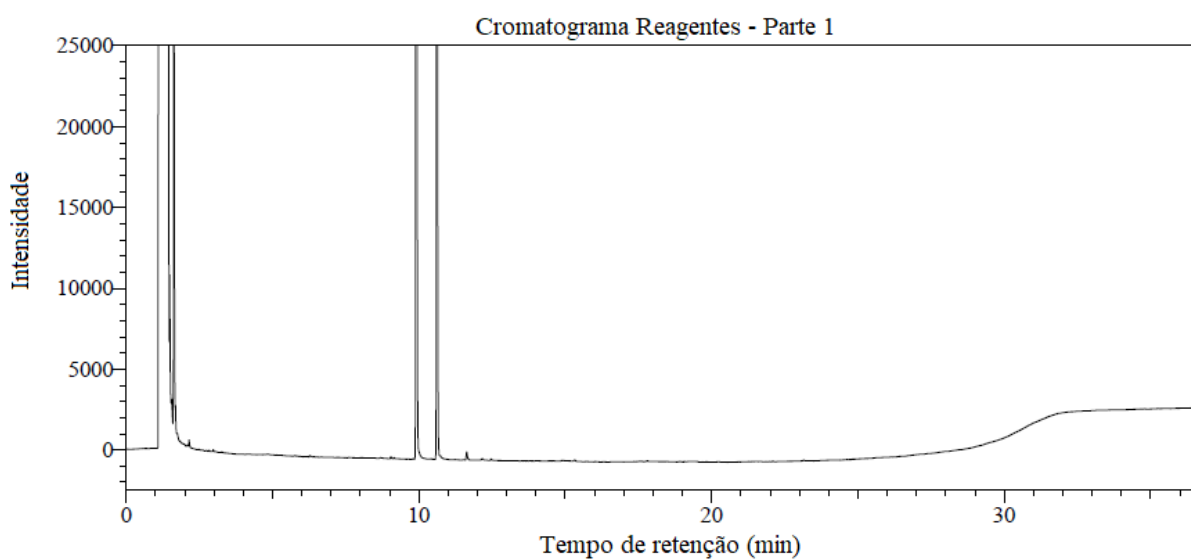
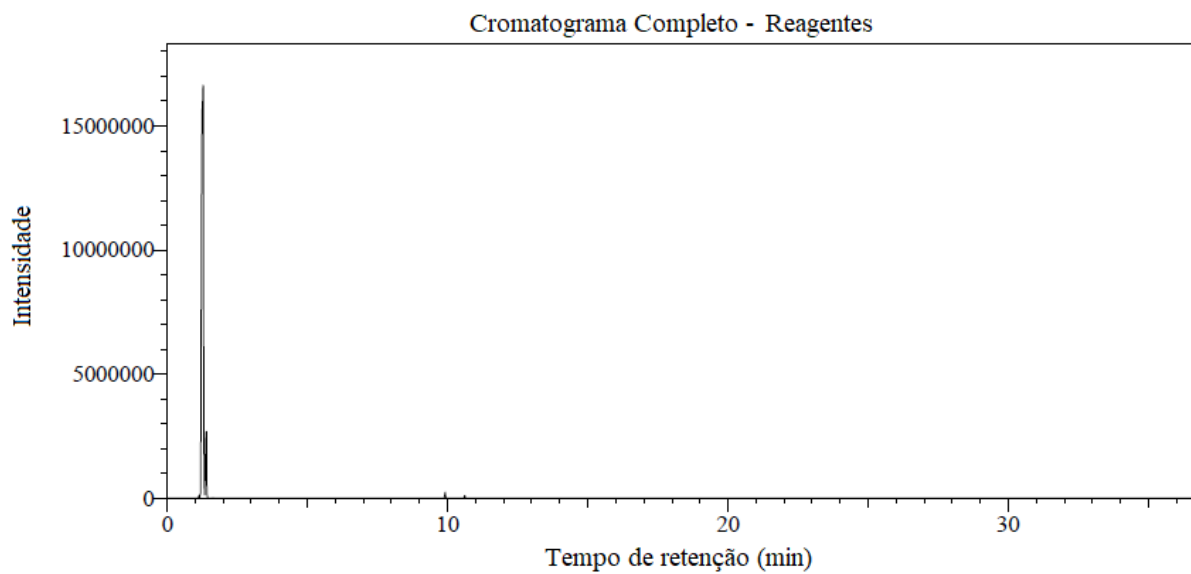
WARTH, A. H. **The Chemistry and Technology of Waxes**. Second ed. Baltimore, Md.: The Waverly Press, 1956.

WEHTJE, E.; COSTES, D.; ADLERCREUTZ, P. Continuous Lipase-Catalyzed Production of Wax Ester Using Silicone Tubing. **JAACS, Journal of the American Oil Chemists' Society**, v. 76, n. 12, p. 1489–1493, 1999.

WILLIAMS, D. F.; SCHIMITT, W. H. (EDS.). **Chemistry and Technology of the Cosmetics and Toiletries Industry**. Second ed. London: Chapman & Hall, 1996.

WITTCOFF, H. A.; REUBEN, B. G.; PLOTKIN, J. S. **Industrial Organic Chemicals**. Second ed. New Jersey: John Wiley & Sons, 2004.

APÊNDICE I – CROMATOGRAMA REAGENTES



APÊNDICE II – CROMATOGRAMA PRODUTOS

